

ESTUDIOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN TRASPLANTE

X

Claudia Perez
Bioquímica Nacional

El presente trabajo final es presentado como requisito indispensable para optar al grado académico de Especialista en Inmunohematología, de la Universidad Nacional de Rosario y en ninguna otra ocasión ha sido presentado para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. El mismo contiene una profunda revisión bibliográfica sobre “Estudios de Histocompatibilidad en Trasplante”, el mismo ha sido realizado en el período comprendido entre septiembre 2016 y octubre 2018, bajo la dirección de la Dra. Silvia García Borrás.

INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	7
OBJETIVOS GENERALES.....	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
TRASPLANTE.....	8
SISTEMA HLA.....	18
INMUNOLOGIA APLICADA.....	31
CONCLUSIÓN.....	57
GLOSARIO.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	61

Resumen

El trasplante es el tratamiento de elección en muchos pacientes con órganos o tejidos lesionados por distintas causas de manera irreversible, en un gran número de ellos significa una oportunidad de vida y en otros una mejora significativa de la calidad de la misma.

La primer barrera con la que se encuentra un trasplante es la de superar aquellas reacciones por parte del sistema inmune.

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) constituye un grupo de antígenos de la superficie celular que definen la naturaleza propia o alogénica de las células, tejidos u órganos trasplantados, y generalmente son los responsables de generar respuesta inmune en un trasplante. Estos antígenos se expresan mayoritariamente en linfocitos.

Este sistema está codificado por una serie de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6. Estos genes son heredados en forma mendeliana codominante en un bloque o haplotipo desde cada uno de los cromosomas del padre y de la madre, constituyendo ambos haplotipos el perfil HLA de cada individuo. Los cromosomas de los padres también pueden transmitir a sus hijos otros determinantes antigénicos menores que aún no han sido completamente identificados, y al igual que los anteriores pueden estimular y generar una respuesta inmune.

En el caso de individuos no relacionados genéticamente como en el caso de trasplante con donante cadavérico no es posible identificar haplotipos y se habla de match de determinantes individuales. En trasplante clínico los más estudiados e importantes del CMH son los antígenos A, B, y DR, pudiendo existir una compatibilidad perfecta de seis match (rara vez), diferentes grados de compatibilidad o nula compatibilidad en el caso de cero match.

De acuerdo al tipo de trasplante son los requerimientos de compatibilidad con los que debe cumplir. El laboratorio de histocompatibilidad es el encargado de realizar los exámenes entre receptor y donante con la finalidad de determinar el grado de compatibilidad entre ellos, algunas de las pruebas a realizar son la tipificación HLA, pruebas cruzadas (crossmatch) linfocitarias, detección y monitoreo de

anticuerpos anti HLA (PRA) como también la construcción y actualización de la seroteca del laboratorio de histocompatibilidad.

INTRODUCCION

El trasplante de órganos y tejidos humanos es uno de los avances más importantes de la medicina moderna. Es el resultado de una larga serie de investigaciones realizadas dentro de las diversas especialidades médicas, las cuales han permitido el éxito de los trasplantes, así como el correcto manejo de la terapia inmunosupresora.

El trasplante es un tratamiento médico que consiste en reemplazar órganos o tejidos dañados, irreversiblemente lesionados, que pueden provocar la muerte del paciente a corto o mediano plazo.

En determinados pacientes constituye la única oportunidad para continuar con vida y para otros es la mejor alternativa de tratamiento.

La existencia del sistema inmunitario complica este procedimiento, debido a que la exposición a los antígenos extraños del injerto induce una respuesta que puede provocar el rechazo del trasplante. Los trasplantes se clasifican de acuerdo a las diferencias genéticas entre el donante y receptor, según el lugar donde se implanta el injerto, así como también, según el tipo de donante, vivo o cadavérico (1).

El estudio del rechazo de injertos de piel en ratones, condujo al descubrimiento del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). En el hombre, el CMH se denomina Sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos (Sistema HLA). La función de los antígenos del Sistema HLA de un individuo, es presentar antígenos extraños a los linfocitos T (LT) e iniciar de este modo, una respuesta inmune apropiada. En el desarrollo de esta respuesta, las poblaciones de LT son específicas tanto para el antígeno como para las diferentes clases de antígenos HLA. Las moléculas HLA de clase I, presentan péptidos antigénicos a los LT CD 8. En cambio, las moléculas HLA de clase II, presentan péptidos a los LT CD 4 (2).

Si bien el enorme polimorfismo poblacional del Sistema HLA, es una ventaja del sistema inmunitario, ya que le permite presentar un gran número de péptidos antigénicos, representa una desventaja cuando se intenta trasplantar un órgano entre individuos no relacionados familiarmente.

Debido a que el sistema inmune es una barrera a superar con la finalidad de optimizar la supervivencia del injerto y minimizar posibles reacciones inmunológicas de rechazo, antes de proceder a realizar un trasplante, es necesario evaluar la compatibilidad antigénica entre el receptor y el donante y la

pesquisa de anticuerpos preformados. Para tal fin se llevan a cabo los siguientes estudios bioquímicos:

- 1- Determinación del grupo sanguíneo, de los Sistemas ABO y Rh
- 2- Tipificación de los alelos HLA de clase I y de clase II
- 3- Realización de pruebas cruzadas o cross match donante - receptor
- 4- Monitoreo y detección de anticuerpos anti-HLA mediante un panel de linfocitos o antígenos HLA purificados

JUSTIFICACIÓN

El procedimiento de trasplante para muchos pacientes significa una oportunidad de vida y en otros casos una mejora notable de su calidad de vida, para aquellos órganos dañados de forma irreversible.

La existencia del sistema inmunitario es la primera barrera a superar en este tipo de tratamiento, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) constituye un grupo de antígenos de la superficie celular, estos antígenos se expresan mayoritariamente en los linfocitos y generalmente son los responsables de generar una respuesta inmune en un trasplante.

El enorme polimorfismo poblacional del Sistema HLA, es una ventaja del sistema inmunitario, ya que le permite presentar un gran número de péptidos antigénicos, también representa una desventaja cuando se realiza un trasplante entre individuos no relacionados familiarmente ya que pueden estimular y generar una respuesta inmune.

A fin de minimizar las posibles reacciones inmunológicas de rechazo como así también un correcto manejo de la terapia inmunosupresora el laboratorio de histocompatibilidad es el encargado de realizar antes de proceder a un trasplante los exámenes entre receptor y donante con la finalidad de determinar el grado de compatibilidad entre ellos, pruebas cruzadas (crossmatch) linfocitarias, como también la detección y monitoreo de anticuerpos anti-HLA (PRA) que pueden significar una menor sobrevida del órgano trasplantado.

OBJETIVOS GENERALES

- Describir los estudios o exámenes que realiza el laboratorio de histocompatibilidad entre receptor y donante antes de un procedimiento de trasplante, dependiendo de los requerimientos de compatibilidad con los que debe cumplir de acuerdo al tipo de trasplante.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Ampliar y actualizar conocimientos acerca de trasplante y respuesta inmune, tipos de trasplantes, requerimientos de compatibilidad y tipos o fases de rechazos
- Conocer y profundizar en el fundamento, procedimientos, ventajas y desventajas de las distintas técnicas que realiza el laboratorio de

histocompatibilidad antes de un trasplante a fin de aumentar las sobrevida del órgano a trasplantar.

Trasplante

El trasplante es el tratamiento indicado en enfermedades que anulan la función de un órgano o la reducen de tal manera que la insuficiencia resultante es incompatible con la vida, mientras el resto del organismo mantiene su función intacta.

Clasificación de los trasplantes

- a) Según la relación genética entre el donante y receptor de un trasplante.
- Autotrasplante: es el trasplante del tejido de una parte sana del cuerpo a otra dañada, de la misma persona. El paciente actúa como donante y receptor a la vez. Se denomina también trasplante autólogo. Figura 1.
 - Isotrasplante: el órgano es trasplantado entre individuos genéticamente idénticos. El donante es genéticamente idéntico al receptor (gemelos univitelinos). Figura 1.
 - Alotrasplante: el órgano es trasplantado entre individuos que no son genéticamente idénticos. Constituyen la mayoría de los trasplantes. El injerto se puede obtener de una persona fallecida, un donante vivo con relación de parentesco o de un donante vivo sin relación de parentesco. Figura 1.
 - Xenotrasplante: en este caso el implante procede de un donante de otra especie diferente a la del receptor. Figura 1.
- b) Según su sitio de implantación
- Trasplante ortotópico: el órgano trasplantado ocupa el mismo lugar que ocupaba el órgano dañado
 - Trasplante heterotópico: el órgano trasplantado ocupa un lugar distinto al que ocupaba el órgano dañado en el cuerpo. El órgano del paciente permanece como apoyo del órgano del donante y se injerta el órgano nuevo en un lugar distinto del que ocupa el del paciente. No se elimina el órgano enfermo. Es muy frecuente en trasplantes renales.

Tipos de donantes

- a) Donante vivo: se realiza generalmente entre parientes. Los órganos dobles y tejidos a trasplantar son los siguientes: riñón, pulmón, segmentos hepáticos, sangre del cordón umbilical, progenitores hematopoyéticos y médula ósea.

- b) Donante cadavérico: En este caso el donante es un individuo fallecido con diagnóstico de muerte encefálica, en el cual los órganos a trasplantar son mantenidos funcionales hasta el trasplante, realizando la irrigación de los órganos a ser trasplantados en forma artificial. Las principales causas de muerte de las personas cuyos órganos son donados por sus familiares son los accidentes de tráfico debido a los traumatismos craneoencefálicos y los accidentes cerebrovasculares. Por muerte encefálica se entiende el cese irreversible y permanente de las funciones de todas las estructuras cerebrales, siendo esta situación, incompatible con la vida. Esto se confirma mediante un electroencefalograma isoelectrico o plano, además de otras pautas técnicas que aseguran la irreversibilidad del proceso que lleva irremediablemente a la muerte. En nuestra legislación, la ley 21541 y el decreto reglamentario 3011 autoriza a un equipo formado por un clínico, un neurólogo o neurocirujano y un cardiólogo a certificar el fallecimiento de un dador mediante: 1) electroencefalograma practicado en las condiciones que exige el artículo 21 de la citada ley; 2) la ausencia de respiración espontánea; 3) pupilas midriáticas o en posición intermedia pese a estímulos fóticos intensos; 4) ausencia de reflejos oculoencefálicos durante las rotaciones cefálicas pasivas; 5) pruebas calóricas vestibulares negativas. Una vez obtenido el donante y cumplidos los requisitos de la ley, se suelen realizar ablaciones múltiples (riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas, intestino, córneas, huesos, segmentos osteotendinosos, válvulas cardíacas, segmentos vasculares y piel). Estos órganos, reciben irrigación por vasos exclusivos y dada la especialización de sus estructuras celulares y su elevada demanda metabólica toleran escasos tiempos de isquemia. Es fundamental para el éxito del trasplante, la conservación óptima del órgano a implantar, controlar su función hasta la ablación y preservarlo correctamente durante en el período de isquemia fría hasta la reperfusión en el receptor. Necesitan también ser perfundidos con soluciones de preservación a bajas temperaturas durante su transporte para evitar alteraciones electrolíticas y ácido base del medio intracelular, las alteraciones de toxicidad extracelular y el efecto deletéreo de los radicales libres del oxígeno entre otras cosas.

El operativo de trasplante comienza con la denuncia de un potencial donante, continúa con el proceso de procuración que mantiene en buen estado los órganos y tejidos del cadáver hasta que los mismos son ablacionados y posteriormente transportados en condiciones especiales y en un período de tiempo limitado, hasta donde se encuentra el receptor; para ser finalmente implantados.

TIPOS DE TRASPLANTES

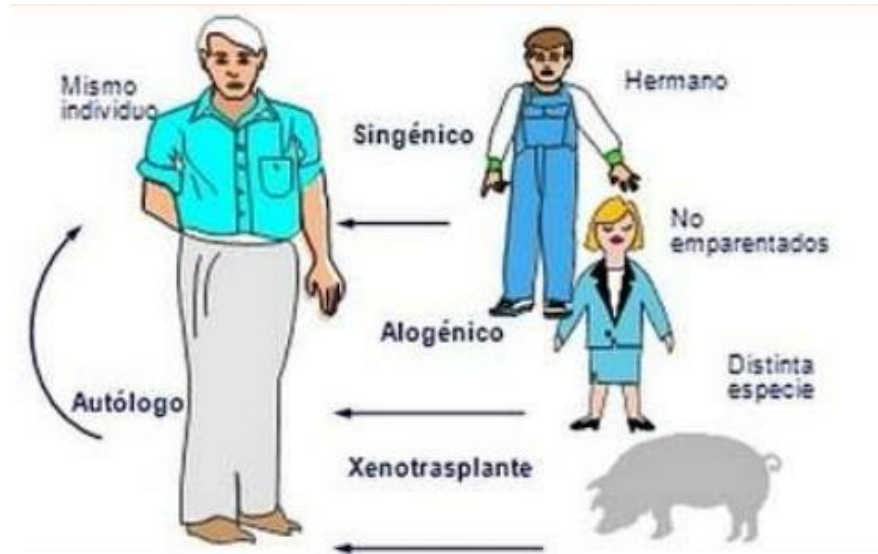


Figura 1. Tipos de trasplante según la relación genética entre donante y receptor de trasplante.

Selección del donante

Hay determinados criterios de selección del donante, hay algunos generales y otros de acuerdo al órgano o tejido a trasplantar y en relación a cada trasplante (enfermedad neoplásica, infecciones, antecedentes de internación psiquiátrica, embarazo, otras patologías a evaluar en cada caso).

Evaluación del potencial donante

- Evaluación de la historia clínica
- Examen físico
- Datos analíticos
- Estudios serológicos
- Estudios de Histocompatibilidad
- Estudios complementarios

El mayor inconveniente para el progreso de la técnica y el desarrollo de los trasplantes radica en el fenómeno de rechazo; para minimizarlo, se busca la mayor compatibilidad genética entre el donante y el receptor. Es fundamental lograr la compatibilidad antigénica de los grupos sanguíneos del Sistema ABO y de los antígenos del Sistema HLA presente sobre la membrana de las células nucleadas. De todas formas, posteriormente al trasplante, el receptor, deberá

recibir fármacos inmunosupresores para evitar que el órgano sea reconocido como extraño y se produzca un rechazo (3).

Trasplante y Respuesta Inmune

Histocompatibilidad

En la mayoría de los casos, el mayor impedimento para que un trasplante tenga éxito es la respuesta inmune adaptativa contra los tejidos trasplantados.

En la transfusión, que es el primero y más frecuente de los trasplantes de tejidos, la sangre del donante y receptor, deben ser compatibles con respecto a los antígenos de los grupos sanguíneos de los Sistemas ABO y Rh, para evitar la rápida destrucción de los eritrocitos, por anticuerpos ABO incompatibles. Debido a que estos sistemas son poco polimórficos, compatibilizar donante-receptor es relativamente fácil. La compatibilidad ABO constituye el primer nivel de restricción en trasplante (4,5).

Sin embargo, cuando se trasplantan tejidos que contienen células nucleadas que expresan antígenos HLA, casi siempre se presenta una reacción inmune contra el órgano o tejido trasplantado, debido a su gran polimorfismo e inmunogenicidad.

La compatibilidad HLA entre donante y receptor aumenta el porcentaje de éxito de los trasplantes, por lo tanto, las diferencias genéticas entre ambos, pueden desencadenar el fenómeno de rechazo.

Cuando el donante y el receptor difieren en sus antígenos HLA, la respuesta inmunitaria se dirige contra las moléculas HLA no propias expresados por el injerto.

Aunque los estudios de Histocompatibilidad, mejoran significativamente el porcentaje de éxito de los trasplantes, no evitan las reacciones de rechazo. Esto puede deberse a imprecisiones en la tipificación HLA o a la disparidad donante-receptor de los antígenos H menores. Los antígenos H menores, están codificados por genes no HLA. Son péptidos derivados de proteínas polimórficas que son presentados por las moléculas del órgano trasplantado (6).

Antígenos Que Participan en Trasplantes

<u>Antígenos</u>	<u>Polimorfismo</u>
1) ABO	limitado
2) CMH	muy polimórfico
3) Antígenos H menores no HLA	limitado
4) Xenoantígenos	extremadamente polimórficos

Tipos o fases de rechazo en un trasplante

El rechazo de un trasplante ocurre cuando las células del injerto expresan antígenos HLA distintos a los del receptor y estimulan su respuesta inmunitaria. El rechazo de un aloinjerto muestra dos características típicas de la inmunidad adaptativa, memoria y especificidad. Se puede clasificar, de acuerdo al tiempo y los mecanismos inmunológicos involucrados. La disparidad genética entre el donante y receptor ayuda a predecir la evolución de los trasplantes (7). Figura 2.

Un aloinjerto es rechazado por el huésped en un período de varios días, este proceso se conoce como “rechazo primario” y es mediado por linfocitos T.

Un injerto procedente del mismo donante y trasplantado al mismo receptor es rechazado mucho más rápidamente, esto se conoce como “rechazo secundario” y es un ejemplo de memoria inmunológica, una de las características clave de la inmunidad adaptativa y está mediada por anticuerpos y linfocitos T.

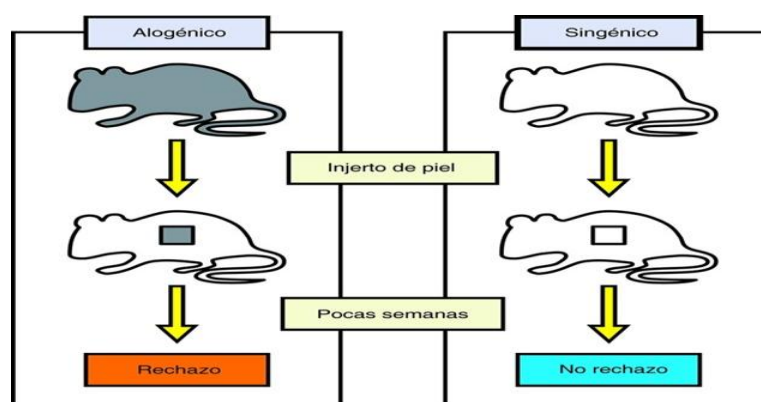


Figura 2. El injerto de piel entre cepas de ratones es aceptado o rechazado según sus CPH. Trasplante singénico y alogénico respectivamente

Dependiendo de la velocidad con la que se produzca, se distinguen los siguientes tipos de rechazo:

- 1) Rechazo hiperagudo, es el que se produce sólo horas o incluso minutos después del injerto. Esta forma de rechazo, se debe a la presensibilización del receptor contra el donante. Es el rechazo fulminante mediado por anticuerpos, cuando el receptor se halla previamente sensibilizado por embarazo, transfusión o trasplante previo o bien porque no se ha tomado el recaudo de controlar que exista compatibilidad ABO. Como ya se mencionó constituye el primer nivel de compatibilidad requerida. La expresión histopatológica del fenómeno de rechazo es la destrucción del injerto en las horas o minutos que siguen a la revascularización, por trombosis o infarto de los pequeños vasos del injerto, por lo que son ineficaces todas las técnicas de inmunosupresión como tratamiento (8,9). Figura 3. Es por ello que la evaluación pre trasplante debe constar de:
 - a) verificar la compatibilidad donante-receptor del Sistema ABO
 - b) realizar pruebas cruzadas donante-recetor, para analizar si existen anticuerpos preformados en el receptor
 - c) tipificar los antígenos del Sistema HLA del donante y el recetor
- 2) Rechazo agudo, es que se produce en la primera semana o meses postrasplante. Ocurre en un 20-40% de los trasplantes cadavéricos. Su mecanismo principal es la reacción del huésped contra el injerto, mediada por linfocitos. Como respuesta de hipersensibilidad retardada, causa la destrucción del injerto al cabo de días o meses, provocando infiltración mononuclear, edema y hemorragia. Se puede tratar este tipo de rechazo mediado por células intensificando la terapia inmunosupresora. Después del rechazo agudo el injerto suele presentar áreas de fibrosis y otras de regeneración (10). Figura 3.
- 3) Rechazo crónico, aparece en períodos más tardíos de evolución del trasplante, meses o años después. Existen evidencias de que el mecanismo subyacente en este rechazo es la incompatibilidad HLA. Tiene muchas veces una progresión insidiosa pero inexorable pese a una inmunosupresión creciente, pues en esta modalidad el daño vascular es lo primero por extrema proliferación endotelial que progresivamente ocluye los vasos del injerto. Figura 3.

TIPOS DE RECHAZO

RECHAZO HIPERAGUDO	RECHAZO AGUDO	RECHAZO CRONICO
<ul style="list-style-type: none"> • Tiene lugar en los primeros minutos de haber realizado el trasplante. • Por acción de anticuerpos pre-existentes en la circulación del receptor. • El rechazo se produce por activación del complemento. • Los anticuerpos involucrados pueden ser de clase IgM o de clase IgG preformados 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiene lugar las primeras semanas del trasplante • Como consecuencia de la respuesta adaptativa, por el reconocimiento directo de HLA del donante • Diferencias de HLA de clase I entre el donante y el receptor se activan los linfocitos T CD8 • Diferencias de HLA de clase II se activan los linfocitos T CD4 <p>Provocando vasculitis o trombosis</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ocurre meses o años después de realizado el trasplante • Caracterizado por pérdida progresiva de la función del órgano trasplantado • Fibrosis y engrosamiento de las paredes vasculares • Su patogénesis no es muy conocida • Intervención de citosinas que estimulan los fibroblastos <p>Acumulo de agresiones</p>

Figura 3. Resumen de los distintos tipos de rechazos, velocidad de evolución y mecanismos celulares y humorales involucrados.

Enfermedad injerto versus huésped

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) es una de las principales complicaciones del trasplante de médula ósea.

La médula ósea reconoce los tejidos del receptor como extraños causando una enfermedad inflamatoria grave caracterizada por sarpullidos, diarrea y neumonía.

Es una complicación que puede ocurrir después de un trasplante de médula ósea o de células madre. En esta enfermedad, las células de donante recientemente trasplantadas atacan el organismo del receptor del trasplante, o puede aparecer por incompatibilidades entre antígenos H menores entre el donante y el receptor histoidénticos (11).

Para controlar estos procesos es necesaria una adecuada terapia inmunosupresora desde el momento del trasplante.

Antes de un trasplante, se analizan el tejido y las células de los posibles donantes para ver qué tan compatibles son con la persona que recibe dicho trasplante. La

EICH es menos probable que ocurra o los síntomas serán más leves cuando la compatibilidad es alta. La posibilidad de que se presente EICH es:

- Alrededor del 30 a 40% cuando el donante y el receptor están emparentados.
- Alrededor del 60 a 80% cuando el donante y el receptor no están emparentados.

Síntomas

Existen dos tipos de EICH: aguda y crónica. Los síntomas en ambas van de leves a graves.

La EICH aguda generalmente ocurre dentro de los primeros 6 meses después de un trasplante. Los síntomas agudos comunes abarcan:

- Dolor o cólicos abdominales, náuseas, vómitos y diarrea
- Ictericia (coloración amarillenta de la piel o los ojos) u otros problemas del hígado
- Erupción cutánea, picazón, enrojecimiento en áreas de la piel

La EICH crónica generalmente comienza más de 3 meses después de un trasplante y puede durar toda la vida. Los síntomas crónicos pueden abarcar:

- Resequedad en los ojos o cambios en la visión
- Boca seca, parches blancos dentro de la boca y sensibilidad a los alimentos picantes
- Fatiga, debilidad muscular y dolor crónico
- Dolor o rigidez en las articulaciones
- Erupción cutánea con áreas levantadas y decoloradas, así como endurecimiento o engrosamiento de la piel
- Dificultad para respirar
- Sequedad vaginal
- Pérdida de peso

Pruebas y exámenes

Se pueden hacer varias pruebas de laboratorio y exámenes médicos para diagnosticar y controlar problemas causados por la EICH.

Una biopsia de piel, o de las membranas mucosas bucales o de otras partes del cuerpo, puede ayudar a confirmar el diagnóstico.

Inmunosupresión

Luego de realizado el trasplante, la lucha contra el rechazo está presidida por la inmunosupresión con drogas que hagan tolerables inmunológicamente las diferencias que quedan después de realizado el descarte de compatibilidades por medio de la tipificación tisular y las pruebas cruzadas.

A excepción de los isoinjertos la inmunosupresión no puede detenerse después del trasplante, pero a altas dosis sólo se debe usar las primeras semanas o durante la crisis de rechazo. Posteriormente, el injerto puede mantenerse con dosis relativamente pequeñas de fármacos inmunosupresores que desde luego tienen efectos adversos menores.

La eficacia de la inmunosupresión solo puede medirse por la respuesta específica e inespecífica de los linfocitos en la sangre periférica y por la funcionalidad del injerto; de modo que la dosis de inmunosupresores solo se regula con base en su toxicidad.

Fármacos inmunosupresores

Prednisona o metilprednisona

Se administra a dosis elevada (2 a 20 mg/kg/d) en el momento del trasplante y luego se va disminuyendo hasta una dosis de mantenimiento de (0.2 mg/kg/d) que debe darse indefinidamente. Debido a los efectos adversos, sobre todo en niños en los que se detiene el crecimiento, en ciertas ocasiones se utiliza a días alternos, pero esto reduce su capacidad inmunosupresora.

Azatioprina

Es un antimetabolito que se usa en el momento mismo del trasplante y que es tolerado indefinidamente por el receptor a dosis de 1,5 a 3 mg/kg/d. Sus efectos adversos son la depresión de la medula ósea.

Ciclofosfamida

Es un agente alquilante y el sustituto para los pacientes que no toleran la azatioprina. Tiene con frecuencia episodios de toxicidad grave, cistitis hemorrágica, alopecia, infertilidad, etc.

Ciclosporina

Su acción es sumamente específica, inhibe de manera intensa la formación de células T citotóxicas, lo cual resulta evidente en cultivos mixtos de linfocitos y evitando el rechazo de aloinjertos con su administración profiláctica. Impide la producción de IL-2, esencial para la proliferación de los clones de linfocitos T reactivos a antígenos, aunque no inhibe las células T supresoras. Su descubrimiento fue fundamental en la evolución de los trasplantes clínicos ya que en combinación con dosis bajas de prednisona suplanta con ventaja a todas las otras drogas debido a su gran efectividad. Su principal desventaja radica en su nefrotoxicidad y en su adsorción en medio liposoluble (leche o aceite) cuando es administrada oralmente.

Otros

Globulina antilinfocitaria (ALG), anticuerpos monoclonales contra células T, e irradiación.

SISTEMA HLA

El sistema inmune está diseñado para identificar y destruir en forma muy eficiente a diferentes microorganismos. Sin embargo, los gérmenes patógenos, poseen ciclos de vida complejos y se alojan en distintos compartimientos extracelulares o intracelulares. Para eliminar al microorganismo sin afectar al huésped, el sistema inmune desarrolló a lo largo de la evolución, algunos mecanismos que permiten identificar fragmentos derivados de los mismos. Estas estructuras son generalmente péptidos, derivados de la degradación de proteínas, producidas en compartimientos intracelulares específicos, capturadas por moléculas especializadas y presentadas al sistema inmune. La presentación de péptidos

microbianos inicia la activación de la respuesta inmune adaptativa y el desarrollo de funciones efectoras que permitirán la eliminación del microorganismo y la generación de la memoria inmunitaria.

En el proceso de presentación de péptidos por moléculas especializadas participan un conjunto importante de proteínas de membrana y citoplasmáticas. Entre las proteínas de superficie se destaca un conjunto de glicoproteínas, codificado por un grupo de genes denominado CMH. Estas células reconocen solamente a antígenos exhibidos en las superficies celulares. Dichos antígenos pueden derivar de agentes patógenos intracelulares, que se replican dentro de las células, o de agentes patógenos o sus productos que son internalizados por las células del fluido extracelular.

Originalmente el CMH fue descrito debido al papel que desempeñan sus moléculas durante el rechazo de un trasplante alogénico. Los experimentos pioneros sobre el CMH consistieron en la realización de injertos de piel entre diferentes ratones. En estos modelos experimentales se observó que el rechazo se debía a una fuerte respuesta inmune contra antígenos expresados por el injerto. Luego, se establecieron cepas de ratones endocriadas, que se caracterizaron por aceptar injertos de piel provenientes de animales de la misma cepa (injertos o trasplantes singénicos) y rechazarlos si eran de una cepa diferente (alogénicos). Posteriormente se demostró que este rechazo se debía a diferencias en una región del genoma que recibió el nombre de CMH (12).

Sin embargo, es absurdo pensar que a lo largo de la evolución, las especies hayan mantenido en su genoma un conjunto de genes que codifican la “histocompatibilidad”, ya que los injertos de piel o trasplantes son un artificio de quirófano que no está relacionado con la selección natural. Desde el comienzo se pensó que el CMH desempeñaba otra función y su característica de molécula de histocompatibilidad era una consecuencia de ella. Esta función primaria comenzó a conocerse en la década del 1970 cuando se demostró que los linfocitos T requieren para su activación el reconocimiento del antígeno en el contexto de las moléculas del CMH.

La principal característica de este sistema es su alto grado de polimorfismo. Este polimorfismo permite que estas moléculas se unan a diferentes péptidos y posee un papel fundamental en trasplantes de órganos y en la susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades. Figura 4.

El Sistema HLA consta de 4 millones de pares de bases, localizados en la porción distal de la banda 6p21.3, en el brazo corto del cromosoma 6, habiéndose identificado cerca de 400 genes. Las moléculas HLA son estructuralmente

polimórficas y se expresan como heterodímeros en la superficie celular. Este polimorfismo extremo ha permitido describir cerca de 490 alelos para *HLA-B*, 250 para *HLA-A*, 119 para *HLA-C* y 135 para *HLA-DRB1*. Estudios familiares demuestran que la recombinación en esta región es rara, y el conjunto completo de alelos se heredan, habitualmente, como una unidad denominada haplotipo, constituyendo el conjunto de los dos haplotipos (uno heredado de cada progenitor) el genotipo del individuo. La herencia de este sistema de antígenos es codominante. Respecto a sus características estructurales y funcionales los genes y moléculas HLA principales se clasifican en clase I y clase II. Figura 5. Los aspectos funcionales están en relación a su capacidad para procesamiento y presentación antigénica. Ésta y el posterior reconocimiento del antígeno es un proceso inmunológico de reconocimiento de lo propio y la capacidad para desarrollar una respuesta inmune específica hacia los antígenos no propios. En un trasplante alogénico, el riesgo de rechazo depende del grado de disparidad genética entre donante y receptor con respecto a las moléculas HLA u otras moléculas de histocompatibilidad. Las secuelas inmunológicas de un injerto incompatible pueden inducir a una disminución en la supervivencia del injerto en trasplante de órganos sólidos y al desarrollo de enfermedad contra huésped en trasplante de médula ósea. Además, pueden ocurrir fenómenos de sensibilización mediante la formación de aloanticuerpos HLA que pueden ser perjudiciales para la evolución del trasplante (13,14).

Aparte del los antígenos de histocompatibilidad, existen otros antígenos codificados por genes no HLA que participan también en los trasplantes y se denominan antígenos menores de histocompatibilidad. Son péptidos derivados de proteínas polimórficas (producidas por las células) que son presentados por moléculas HLA del órgano trasplantado, con especial relevancia en trasplante de médula ósea. Entre estos encontramos los antígenos H-Y, HA-1, GSST, etc

POLIMORFISMOS DEL COMPLEJO HLA CLASE I y CLASE II

A	B		C	DP	DQ	DR	
A1	Bw4	Bw47	Cw1	DPw1	DQw1	DR1	Dw1
A2	B5	Bw48	Cw2	DPw2	DQw2	DR2	Dw2
A3	Bw6	B49	Cw3	DPw3	DQw3	DR3	Dw3
A9	B7	Bw50	Cw4	DPw4		DR4	Dw4
A10	B8	B51	Cw5	DPw5		DR5	
A11	B12	Bw52	Cw6	DPw6		DRw6	
Aw19	B13	Bw53	Cw7			DR7	Dw7
A23	B14	Bw54	Cw8			DRw8	Dw8
A24	B15	Bw55				DRw9	
A25	B16	Bw56				DRw10	
A26	B17	Bw57				DRw11	Dw5
A28	B18	Bw58				DRw12	
A29	B21	Bw59				DRw13	Dw6
A30	Bw22	Bw60				DRw14	Dw9
A31	B27	Bw61				DRw52	
A32	B35	Bw62				DRw53	
Aw33	B37	Bw63					
Aw34	B38	Bw64					
Aw36	B39	Bw65					
Aw43	B40	Bw67					
Aw66	Bw41	Bw70					
Aw68	Bw42	Bw71					
Aw69	B44	Bw72					
	B45	Bw73					
	Bw46						

FIGURA 4. Organización y Polimorfismo del complejo HLA

Organización génica del SISTEMA HLA

La región HLA se puede subdividir en tres subregiones: clase I, clase II, clase III. La región HLA de clase I contiene, (además de los genes clásicos HLA-A, HLA-B, Y HLA-C) otros loci genéticos designados como HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L, MICA y MICB. Figura 5. Estos últimos genes codifican para las proteínas HLA no clásicas o también llamadas de clase Ib y frecuentemente tienen un polimorfismo limitado y niveles bajos de expresión. Algunos genes de clase Ib expresan proteínas no funcionales o no expresan ninguna proteína. Los genes incapaces de expresar productos proteicos funcionales se denominan pseudogenes. Otras proteínas HLA no clásicas han estado asociadas con una variedad de funciones. Por ejemplo, HLA-E se encuentra asociado con el sistema de células natural killer. El antígeno HLA-G se expresa en el trofoblasto y podría estar involucrado en el desarrollo de la tolerancia inmune materna respecto a antígenos fetales (15).

La organización genómica de la región de la clase II (HLA-D) del CMH es más compleja. Las moléculas del CMH de clase II consisten en un complejo no covalente de dos cadenas estructuralmente similares, α y β . Ambas cadenas se codifican dentro del CMH. El polimorfismo de las moléculas HLA clase II resulta de diferencias en ambas cadenas α y β . Este polimorfismo depende de la isoforma de

clase II. Por ejemplo, con HLA-DR, la cadena α es esencialmente monomórfica, pero la cadena β es muy polimórfica. Los diferentes haplotipos tienen distintos números de genes clase II y pseudogenes (15).

Aunque no se considere generalmente parte del sistema HLA, la región CMH de clase III contiene cuatro genes del sistema complemento. Dos de los genes de Clase III, C4A y C4B, codifican variantes de la molécula C4. También incluyen genes tan importantes como los del factor de necrosis tumoral (TNF), los de la enzima 21-hidroxilasa y los que codifican para tres miembros de las proteínas HSP. Las HSP (heat shock proteins) son una familia de proteínas que están presentes en la mayoría de las células y se clasifican según su peso molecular (p. ej., HSP 70 por su peso de 70 KDa). Estas proteínas se producen en grandes cantidades por las células como respuesta al estrés mecánico, a la estimulación con citocinas o a las altas temperaturas como mecanismo de protección frente a condiciones adversas.

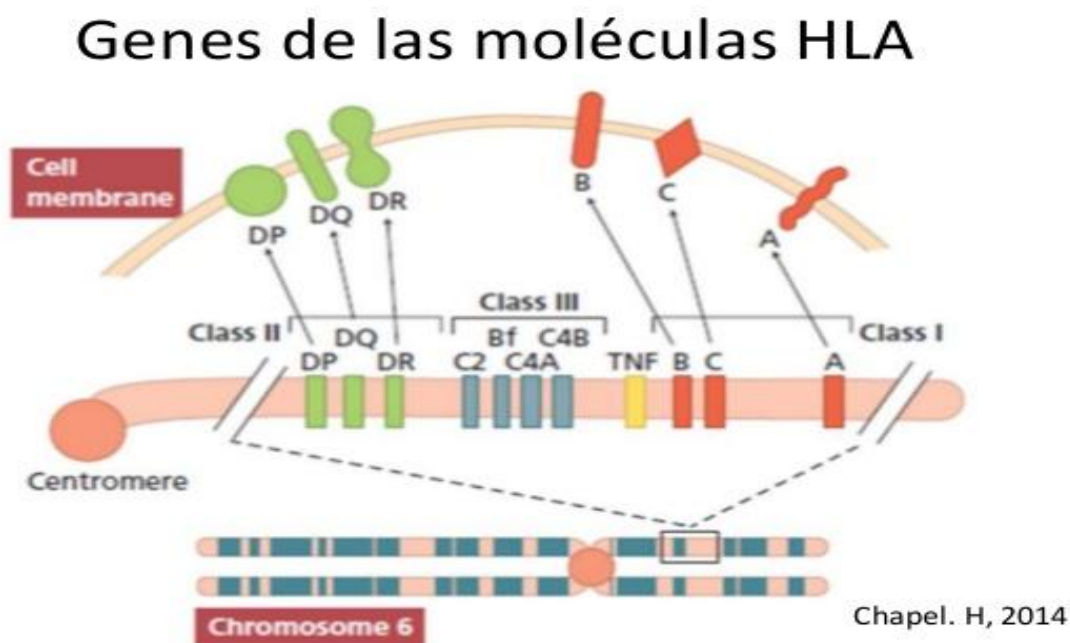


Figura 5. Estructura y organización del CMH en el brazo corto del cromosoma 6.

La herencia del Sistema HLA sigue los principios generales de la genética Mendeliana. Todas las personas poseen dos cromosomas 6 y por lo tanto, dos haplotipos HLA, uno heredado de cada progenitor. Los productos génicos expresados constituyen el fenotipo, que puede ser determinado para un individuo

realizando la tipificación de los antígenos o alelos HLA. Como los genes HLA son autosómicos y codominantes, el fenotipo representa la expresión combinada de los dos haplotipos. Figura 6.

Un niño hereda una copia del cromosoma 6 de cada padre, por lo tanto, un haplotipo CMH de cada progenitor. Como cada progenitor posee dos copias diferentes del cromosoma 6, hay 4 combinaciones de haplotipos posibles en los hijos (en ausencia de recombinación). El patrón de herencia es importante para predecir si los miembros de la familia podrían ser donantes compatibles para trasplante. La probabilidad de que dos hermanos sean HLA idénticos es del 25 %. Tener dos hermanos eleva la probabilidad al 44 % y tres al 58 %. Cualquiera sea el número de hermanos disponibles la probabilidad nunca será del 100 % (al menos que sean hermanos gemelos idénticos).

Patrones de Herencia: La expresión de los alelos de CMH es codominante

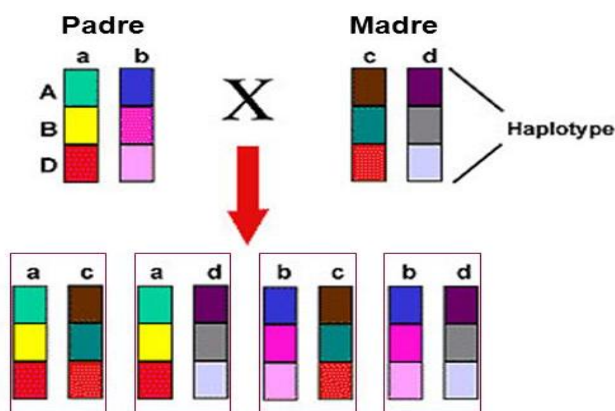


Figura 6. Esquema que muestra la herencia del sistema HLA. Todas las personas poseen 2 cromosomas 6 y por lo tanto dos haplotipos HLA, uno heredado de cada progenitor. La expresión de los alelos de CMH es codominante, o sea cuando dos alelos diferentes están presentes en un genotipo y son expresados.

Genes y moléculas HLA de clase I

Estructuralmente, un gen clásico de MHC de clase I consta de 8 exones. La transcripción de este gen da lugar a la síntesis de un ARNm y la traducción de éste a una proteína de 340 aminoácidos (aa). Los exones 2, 3 y 4 codifican las regiones extracelulares α 1, α 2 y α 3, respectivamente; la mayor variación polimórfica se localiza en las secuencias que codifican los aa 60 a 100 del dominio α 1, y 150 a 200 del dominio α 2. El exón 5 codifica la región transmembrana y, los exones 6, 7 y 8 codifican la región citoplásmica.

Las moléculas HLA de clase I constan de una cadena pesada α de 45 Kda que se une a una cadena ligera de 12 Kda, la β -microglobulina, codificada en el cromosoma numero 15. Ésta se une no covalentemente al dominio α 3 de la cadena pesada y es necesaria para la expresión de la molécula HLA de Clase I en la superficie celular (16).

Las cadenas α son glicoproteínas de membrana y su región extracelular posee unos 300 aa, la porción hidrofóbica transmembrana de 25 aa, que es muy parecida a la de otras proteínas expresadas en membrana, y la región citoplasmática que tiene unos 30 aa. Los tres dominios extracelulares tienen, cada uno, cerca de 90 aa y se extienden desde la región α 3 adyacente a la membrana, a las regiones más distales α 2 y α 1, las cuales tienen restos de carbohidratos. La mayor cantidad de polimorfismo en la secuencia de estas moléculas se localiza en unas regiones hipervariables dentro de los dominios α 1 y α 2. El dominio α 3 tiene un plegamiento del tipo de dominio Igs, es menos polimórfico que los anteriores, y en su estructura se encuentra el sitio de unión a la molécula CD8 del linfocito T. Un dato importante en la determinación del polimorfismo es el hecho de que varios antígenos diferentes pueden compartir una ó más especificidades que reaccionen en forma cruzada.

La β -microglobulina es una proteína no polimórfica de 100 aa que presenta una estructura de dominio de Igs y se codifica fuera del complejo CMH. Esta molécula, a diferencia de la cadena α de las moléculas HLA de clase I, no posee una región transmembrana, por lo que se mantiene unida a través de su interacción con los dominios α 1, α 2, α 3. Su principal función es estabilizar todo el conjunto para que las moléculas de clase I adquieran la estructura terciaria adecuada. Figura 7.

En el año 1987, se publicó la estructura cristalográfica tridimensional de la molécula HLA-A2, lo que originó que se multiplicasen los estudios sobre la relevancia funcional de los sitios de polimorfismo y su unión al receptor de la célula T (TCR). Los sitios de unión con el péptido están formados por una hoja de

8 cadenas β , envuelta por dos regiones de hélice α . Los péptidos se unen en el surco que sitúa entre las dos hélices α , y en contacto con la cara superior de las hojas β , quedando dos dominios de inmunoglobulina por debajo del sitio de unión del péptido. Los péptidos que se pueden unir a las moléculas HLA de clase I suelen tener una longitud más corta, unos 8 a 10 aa, que los que unen a clase II y son, generalmente, de origen endógeno. La localización de los sitios antigénicos polimórficos conducido a especular sobre el papel de estos polimorfismos en los trasplantes de órganos y la susceptibilidad a enfermedades.

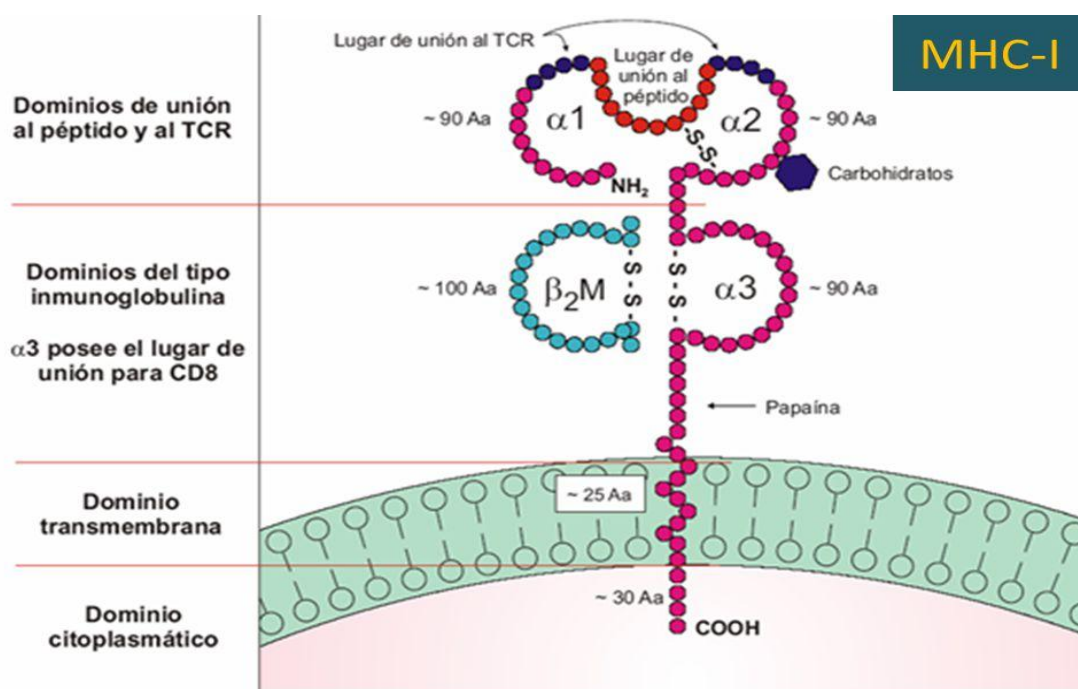


Figura 7. Representación esquemática de las moléculas HLA clase I, mostrando las cadenas polipeptídica alfa y Beta, sus dominios estructurales y las unidades de carbohidratos fijados.

Genes y moléculas HLA de clase II

En cuanto a la organización génica de región HLA de clase II se ha subdividido en las tres que conocemos en la actualidad, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Así, en la subregión HLA-DR, hay un solo gen que codifica para la cadena α , cinco genes para las cadenas β (*HLA-DRB1-5*), y 4 pseudogenes. No todos los genes *HLA-DRB* están presentes en todos los haplotipos, de modo que algunas

combinaciones son específicas de haplotipo, ya que pueden ocurrir varios reordenamientos dentro de este locus (16).

Las subregiones HLA-DQ y DP constan, cada una de ellas, de 2 genes para las cadenas α y 2 para las cadenas β , HLA-DQA1, -DQA2, -DQB1, -DQB2 y -DPA1, -DPA2, -DPB1, -DPB2. Los productos de los genes HLA-DQA1 y -DQB1 se asocian para formar los antígenos HLA-DQ y, análogamente, los productos de los genes HLA-DPA1 y -DPB1 se asocian para formar los antígenos HLA-DP.

El típico gen HLA de clase II para la cadena α , consta de 5 exones, la estructura del gen de la cadena β es muy similar. El polimorfismo de estos genes se concentra en el exón II, que es el responsable de codificar la estructura de la unión al péptido.

Las moléculas HLA de clase II son también glicoproteínas de membrana tipo I y constan de un heterodímero formado por una cadena α de 34 kDa y una cadena β 29 kDa. Esta diferencia de tamaño se debe a la cantidad de carbohidratos de cada cadena (16).

Cada una de ellas consta de una región citoplasmática de 12 a 15 aa, una región transmembrana de 20-25 aa, y una región extracitoplasmática formada por dos dominios de unos 90-100 aa. Los dominios próximos a la membrana de cada cadena, $\alpha 2$ y $\beta 2$, poseen una estructura del tipo de la superfamilia de las Igs, mientras que los dominios distales, $\alpha 1$ y $\beta 1$, forman la estructura de unión al péptido. Las regiones hipervariables, para las moléculas *HLA-DRB1*, son las regiones diana de los métodos de tipificación usados para definir los polimorfismos en el ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las moléculas *HLA-DQ* y *HLA-DP* son polimórficas en ambas cadenas α y β . Figura 8.

La estructura tridimensional de las moléculas HLA de clase II es similar a la estructura de las moléculas de clase I. Las posiciones más polimórficas de las moléculas se encuentran en las regiones terminales de los dominios extracelulares. El péptido que ligan las moléculas HLA de clase II suele ser de origen exógeno, en contraste al carácter endógeno del que ligan los de HLA de clase I.

Las moléculas HLA de clase II presentan los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ proximales a membrana, y un bolsillo de unión al péptido. Este bolsillo presenta ligeras diferencias estructurales con respecto al de las moléculas de clase I, y ellas van a condicionar las características de los péptidos que son capaces de unir. Lo más importante, es el hecho de que, sus extremos se encuentran abiertos y permiten la unión de péptidos de mayor tamaño que las moléculas de clase I.

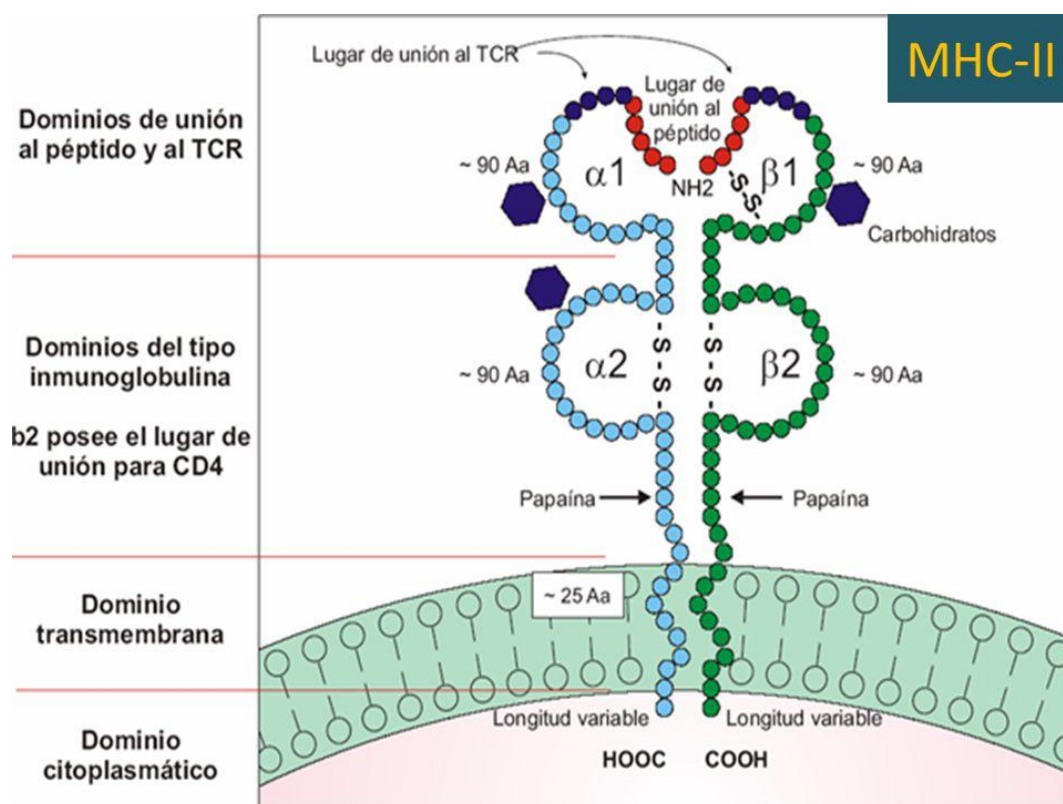


Figura 8. Representación esquemática de las moléculas HLA clase II, donde se muestran las cadenas polipeptídicas alfa y beta con sus dominios estructurales y las unidades de carbohidratos adheridos a las misma.

Expresión de las moléculas HLA en tejidos

Las moléculas HLA de clase I, se expresan en todas las células nucleadas y plaquetas y presentan niveles variables en los distintos tejidos. La expresión de estas moléculas está influenciada por factores como distintas citoquinas y linfoquinas. En comparación con las moléculas de clase I, el rango de tejidos que expresan moléculas de clase II es más limitado pero, las citoquinas, pueden estimular su expresión. Constitutivamente, están presentes en la superficie celular de linfocitos B, monocitos, linfocitos T activados, precursores eritroides, células de langerhans, células de Kupper, astrocitos y células dendríticas, conocidas como células presentadoras de antígenos (CPA) (17).

Además, las moléculas HLA de clase II se encuentran también en determinados endotelios vasculares, ciertos epitelios (tracto gastrointestinal) y glomérulos renales.

Como en las moléculas HLA de clase I, también se han observado diferencias cuantitativas de expresión para las distintas moléculas HLA de clase II. Así, las moléculas HLA-DR están presentes en mayor cantidad que la HLA-DQ Y HLA-DP.

La expresión de dichas moléculas puede verse alterada en situaciones de rechazo o tolerancia del trasplante. Por ejemplo, las células endoteliales de los órganos trasplantados pueden alcanzar alta expresión de HLA de clase II.

Función biológica

La función principal del Sistema HLA es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T. Los linfocitos T interactúan con los antígenos peptídicos. Este proceso tiene lugar solamente, cuando los receptores de antígenos de las células T (RTC) involucran a las moléculas HLA y a los antígenos peptídicos contenidos en los surcos de unión al péptido. Esta limitación se denomina “restricción CMH”.

En el timo, se seleccionan los linfocitos T cuyos TCR se unen a las moléculas de HLA propias (selección positiva), con la excepción con TCR que también se unen a un péptido derivado de un antígeno propio, en cuyo caso los linfocitos T se suprimen (selección negativa).

Las moléculas de Clase I se sintetizan y los antígenos peptídicos se insertan en el lugar de unión al péptido, en el retículo endoplásmico. Los péptidos antigénicos que se unen en el surco de las moléculas de Clase I tienen ocho o nueve aminoácidos de longitud y derivan de proteínas producidas por las células (proteínas endógenas). Estas proteínas endógenas, que pueden ser proteínas propias normales, propias alteradas, como las células neoplásicas, o proteínas virales, como la de las células infectadas por virus, se degradan en el citosol por acción de proteasas y se transportan al retículo endoplásmico por transportadores específicos. Las moléculas de clase I se expresan en la membrana de todas las células nucleadas, donde pueden interactuar con los linfocitos T CD8 positivo. Si el TCR de un linfocito T CD8 puede fijar los antígenos peptídicos en el contexto de las moléculas de clase I específicas que los exhiben, esta unión activa las propiedades citotóxicas de los linfocitos T, que atacarán a la célula y desencadenarán una respuesta inflamatoria (17).

La presentación de los antígenos por parte de las moléculas de clase I es de particular importancia en la defensa del huésped contra los patógenos virales. Figura 9. También se ha observado que las células tumorales que no expresan moléculas de Clase I escapan a este control inmunológico.

VÍA ENDÓGENA

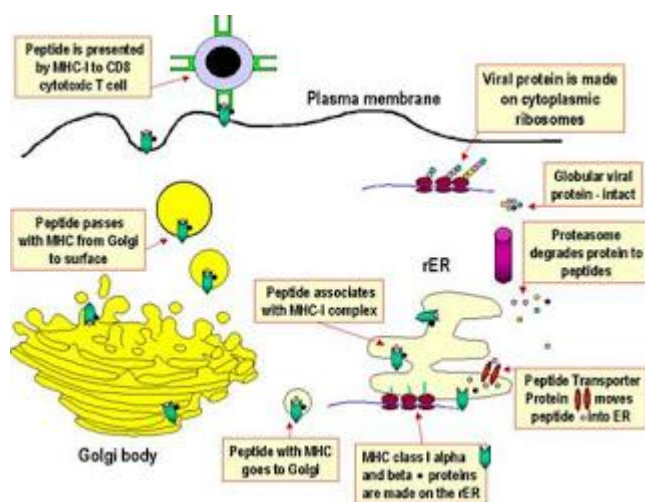


Figura 9. Diagrama que muestra la secuencia en el procesamiento de antígenos citosólicos. Las moléculas de Clase I presentan a los linfocitos T CD8, péptidos endógenos derivados de proteínas intracelulares propias o de proteínas extrañas de agentes microbianos que infectaron la célula

Así como las moléculas de clase I, también las moléculas de clase II se sintetizan en el retículo endoplásmico. En estas moléculas, primero, en el surco de unión al péptido, se inserta una cadena invariante (Ii). Posteriormente, en el endosoma, esta cadena es removida por una molécula de clase II especializada, llamada HLA-DM. El locus DM también se localiza en el CMH. Luego, los antígenos peptídicos de clase II se insertan en el surco de unión al péptido. Estos antígenos péptidos que se insertan en el surco de las moléculas de clase II, tienen generalmente de 12 a 25 aminoácidos de longitud y derivan de proteínas captadas por las células mediante endocitosis. Estas proteínas exógenas, que pueden ser propias o provenientes de patógenos como las bacterias y se degradan a péptidos por acción de enzimas de la vía endosómica. Las moléculas de clase II son transportadas a la superficie celular, donde pueden interactuar con los linfocitos T CD4 positivo, éstos responden secretando citoquinas estimuladoras (17). Este mecanismo es importante en la producción de anticuerpos. Figura 10.

VÍA EXÓGENA

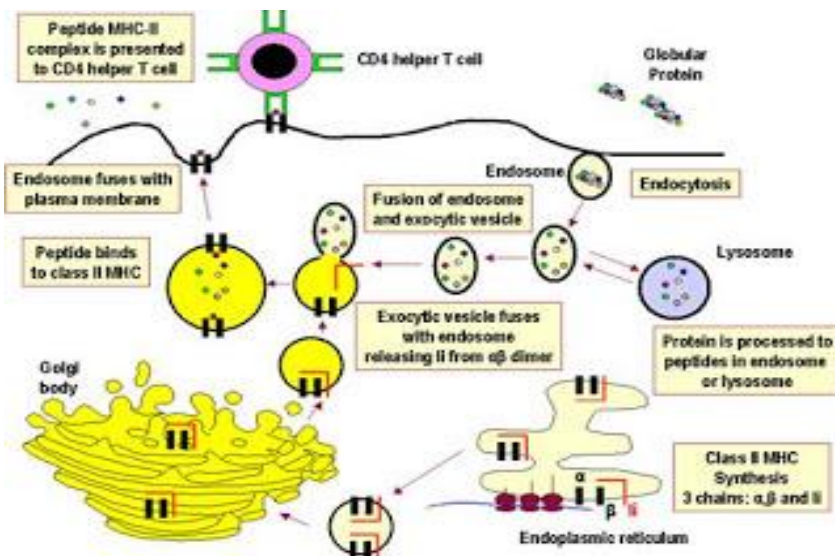


Figura 10. Diagrama que muestra la secuencia en donde las moléculas de Clase II presentan a los linfocitos T CD4 antígenos proteicos que fueron endocitados y procesados en el linfocito B o macrófagos

Nomenclatura de los antígenos HLA

La nomenclatura del sistema HLA es definida por un comité internacional patrocinado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta nomenclatura se actualiza regularmente para incorporar nuevos alelos HLA. Los antígenos HLA se designan con la sigla HLA, seguida de una letra según el locus donde se codifica el alelo HLA, y luego un número (por ejemplo, HLA-A1 o HLA-B8).

El desarrollo de nuevos métodos de tipificación HLA, permitió descubrir que antígenos, que se creía representaban una especificidad única, fueran divididos en especificidades serológicas diferentes y luego, genéticamente diferentes. Para designar un nuevo alelo, el requerimiento mínimo es la secuencia de los exones dos y tres del HLA de Clase I y del exón dos del HLA de Clase II (*DRB1*). Estos exones codifican los aminoácidos variables que confieren la especificidad antigénica del HLA. Se adoptó una nomenclatura uniforme que tiene en cuenta el locus, la especificidad serológica principal y el grupo de alelos que se determina por técnicas de tipificación molecular (18). Figura 11. Por ejemplo, la

secuenciación de nucleótidos ha identificado al menos 90 secuencias de aminoácidos del exón dos generando nuevas variantes (alelos) del *HLA-DR4*. La primera variante *HLA-DR4* se denomina *DRB1*04:01*, que indica el locus (DR), la proteína (cadena β1), un asterisco para denotar que le sigue el nombre de un alelo (y que la tipificación se determinó mediante técnicas moleculares), la especificidad serológica principal (04 para HLA-DR4), y el número de variación del alelo de la secuencia 2 (variante 01). Un sistema similar se utiliza para denominar a los alelos Clase I.

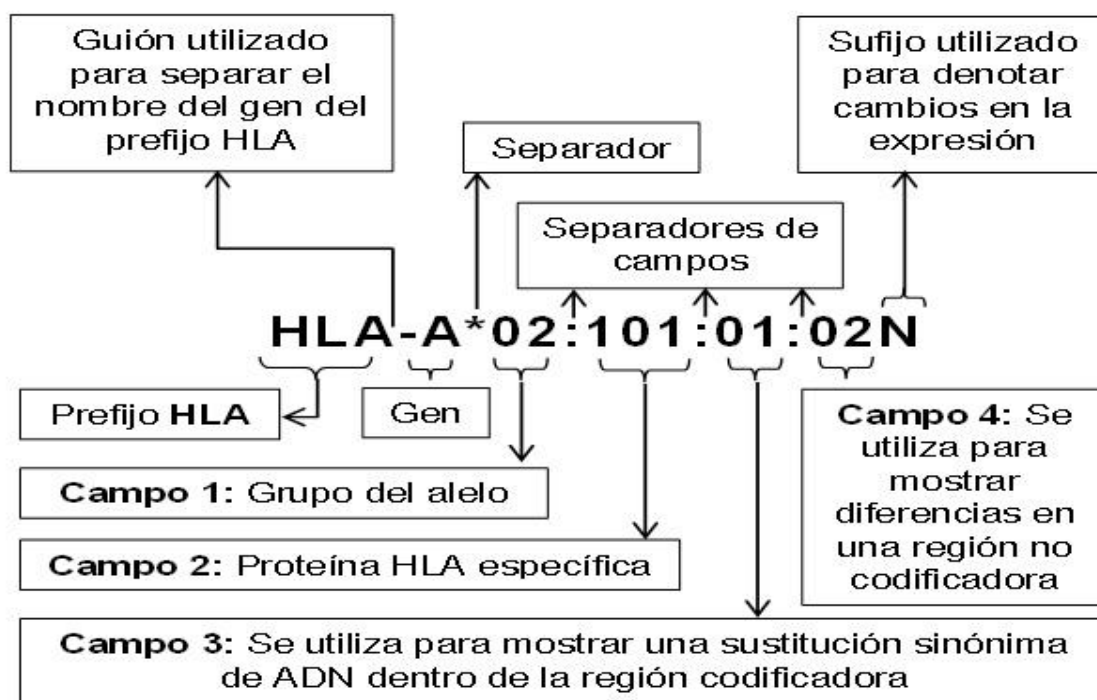


Figura 11. Nomenclatura HLA según normas de la OMS

INMUNOLOGÍA APLICADA

Laboratorio de Histocompatibilidad

El laboratorio de histocompatibilidad está capacitado para realizar los estudios necesarios para trasplante de órganos y tejidos, de acuerdo a los estándares internacionales establecidos.

La importancia de los mismos radica en efectuar el estudio de histocompatibilidad de receptores, donantes vivos y fallecidos según los requerimientos de cada tipo de trasplante. De ésta forma dependiendo del órgano o célula a trasplantar los estudios pueden ser de menor o mayor complejidad (19).

Entre los exámenes requeridos para la actividad de trasplante se encuentran:

- Tipificación HLA de donantes y receptores
- Pruebas cruzadas (cross-match) linfocitarias
- Detección y monitoreo de anticuerpos anti HLA (PRA)
- Mantenimiento de serotecas

En el caso de los potenciales receptores de órganos o tejidos, se estudia con anterioridad y con sus grupos sanguíneos, tipificación HLA y cross-match contra panel, son incluidos en una lista de espera de órganos y tejidos del INCUCAI (Instituto Coordinador Único de Ablación e Implante). Figura 12

La compatibilidad ABO constituye el primer nivel de restricción en trasplante. Los antígenos de los grupos eritrocitarios humanos (ABO) son antígenos potentes en los trasplantes de órganos y tejidos, debido a que los seres humanos presentan de manera natural anticuerpos (Acs) contra los antígenos del mencionado sistema. Su importancia radica en que están presentes en los endotelios vasculares de diversos órganos. Si se trasplanta un órgano a un individuo ABO incompatible, los Acs naturales llamados isoaglutininas Anti A y/o Anti B del receptor producen una lesión tisular en el órgano trasplantado, lo que conduce al rechazo. En consecuencia, el grupo sanguíneo del receptor y el donante debe ser establecido antes de realizar cualquier trasplante del mismo modo que se investiga antes de cualquier transfusión sanguínea (20).

Cabe mencionar que en los programas de trasplante renal y de corazón se siguen las reglas que regulan a la transfusión sanguínea. Sin embargo, hay evidencias de órganos sólidos trasplantados de manera exitosa con diferencias de grupo sanguíneo.

Requerimientos de Compatibilidad

TEJIDO/ÓRGANO	COMPATIBILIDAD REQUERIDA
Transfusión de GR	ABO,RH
Trasplante riñón (HLA-DR)	ABO, clase I (HLA-A y B) y clase II, 6 antígenos matching o el mejor match
Otros órganos sólidos	ABO, (debido al tiempo de isquemia fría no se alcanza a tipificar los alelos HLA
Trasplante de MO	Clase I (HLA-A y B) y Clase II (HLA-DR), no es necesario el match ABO/RH, tipificación HLA de alta resolución

Figura 12. Cuadro que sintetiza los distintos requerimientos de compatibilidad según el tejido/órgano a trasplantar.

Los métodos para detección de antígenos y alelos HLA pueden ser, pruebas serológicas o moleculares (basadas en la tipificación del ADN). Dependiendo de la situación clínica, puede preferirse un método particular de detección o tipificación de antígenos y alelos HLA.

Tipificación de HLA

- Métodos serológicos: Microtest de Linfotoxicidad con consumo de complemento (CDC).
- Métodos moleculares: PCR-SSP (iniciadores de secuencia específica) y PCR-SSO (sondas secuencia específica).

Las técnicas moleculares de baja resolución, brindan información similar a las técnicas serológicas, las de resolución intermedia permiten identificar grupo de alelos y las de alta resolución alelos y sus variantes.

Método serológico

Microtest de Linfotoxicidad con consumo de Complemento

La prueba de microlinfotoxicidad puede emplearse para detectar los antígenos HLA-A, B, C, DR, y DQ. Se utilizan linfocitos obtenidos de sangre periférica anticoagulada con Heparina. También podrían utilizarse linfocitos de origen ganglionar o esplénico. En un principio, los sueros para tipificación HLA provenían principalmente de mujeres múltiples. En la actualidad, se dispone de excelentes antisueros monoclonales (21,22).

El microtest de linfotoxicidad utiliza la técnica de Gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque para la separación de linfocitos. La misma consiste en la separación de las distintas poblaciones celulares según sus densidades, realizando un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (polímero de sacarosa de alto peso molecular y un compuesto yodado) cuya densidad final de 1.077g/ml es igual a la de las células mononucleares. La sangre del paciente debe estar anticoagulada con Heparina diluida al medio con medio de cultivo, se coloca en un tubo una parte de Ficoll-Hypaque y 4 partes de sangre diluida sin romper la interfase y se centrifuga a 1800 rpm durante 20 minutos. Luego de esta centrifugación, los eritrocitos y los granulocitos, que tienen una mayor densidad forman un paquete globular en el fondo del tubo. Las plaquetas permanecen en la fase plasmática y las células mononucleares forman un halo blanco en la interfase. Posteriormente, se recogen las células mononucleares del anillo blanco de la interfase Ficoll-plasma y se llevan a concentración de trabajo para la etapa del test de citotoxicidad.

El test de la citotoxicidad permite detectar los distintos antígenos HLA de clase I y de clase II presentes en la membrana celular, mediante el uso de anticuerpos específicos. Se incuban los linfocitos del paciente obtenidos en la etapa anterior de separación con antisueros de especificidad conocida y luego se agrega suero de conejo como fuente de complemento, si el anticuerpo anti-HLA reconoce el

antígeno de histocompatibilidad sobre la membrana de las células, se une y activa la cascada del complemento, provocando lisis celular. Figura 13. De éste modo se diferencian células vivas de células muertas con el uso de un colorante supravital como la eosina y la observación al microscopio. Cuando se observa una mortalidad celular superior al 50% se considera que dicho antígenos HLA está presente en esas células. Figura 14.

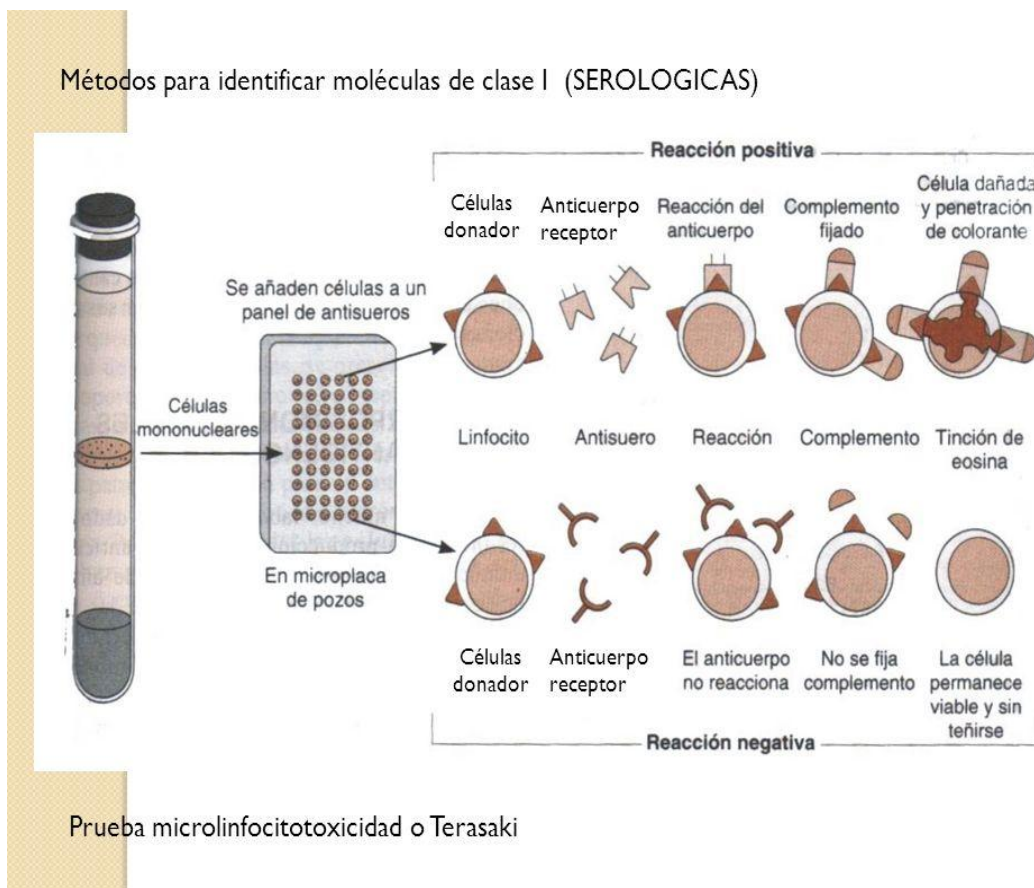


Figura 13. Prueba Serológica o Test de Citotoxicidad, se muestra en el esquema los pasos a seguir de la técnica serológica para tipificación HLA, técnica de baja resolución.

Interpretación Serológica				
Score			Interpretación	
0 %	-10 %	mortalidad	1	Negativo
11%	-20 %	mortalidad	2	Negativo
21%	-50 %	mortalidad	3	positivo débil
51%	-80%	mortalidad	6	positivo
81%	-100%	mortalidad	8	positivo fuerte

Figura 14. Tabla con los distintos porcentajes de mortalidad celular y su correcta interpretación.

Para la tipificación serológica de los antígenos HLA de clase II, se separan los linfocitos B a partir de mononucleares totales, la técnica a implementar utiliza perlas inmunomagnéticas, las cuales tienen adheridas a su superficie anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítopo monomórfico de la cadena β de las moléculas HLA de clase II.

Las células adheridas a las perlas son luego separadas del resto de los mononucleares mediante el uso de un imán.

Tipificación HLA y Resolución

a) Baja resolución:

- Serología
- Biología molecular

Especificidades HLA genéricas:

HLA clase I: A1, A2, A3, B7, B8.....etc.

HLA clase II: DR1, DR15, DR16, DQ2.....etc.

b) Alta resolución:

- Biología molecular

Variantes alélicas genéticas.

HLA clase I: A*0101, A*0102, A*0103, B*0702.....etc

HLA clase II: DRB1*0101, DRB1*0102, DQB1*0201....etc

TIPIFICACION HLA-A B Y DR

Tipificación serológica

Antígeno A28 B40 DR5 (Figura 15)

Subtipos A68 B61 DR11

Tipificación molecular

Baja resolución A*68 B*40 DRB1*11(Figura 15)

Intermedia A*6801/6804 B*4001/4006 DRB*1101/1104/1106 (Figura 15)

Alta resolución A*6801 B*4006 DRB1*1104(Figura 15)

TIPIFICACION DE HLA MOLECULAR

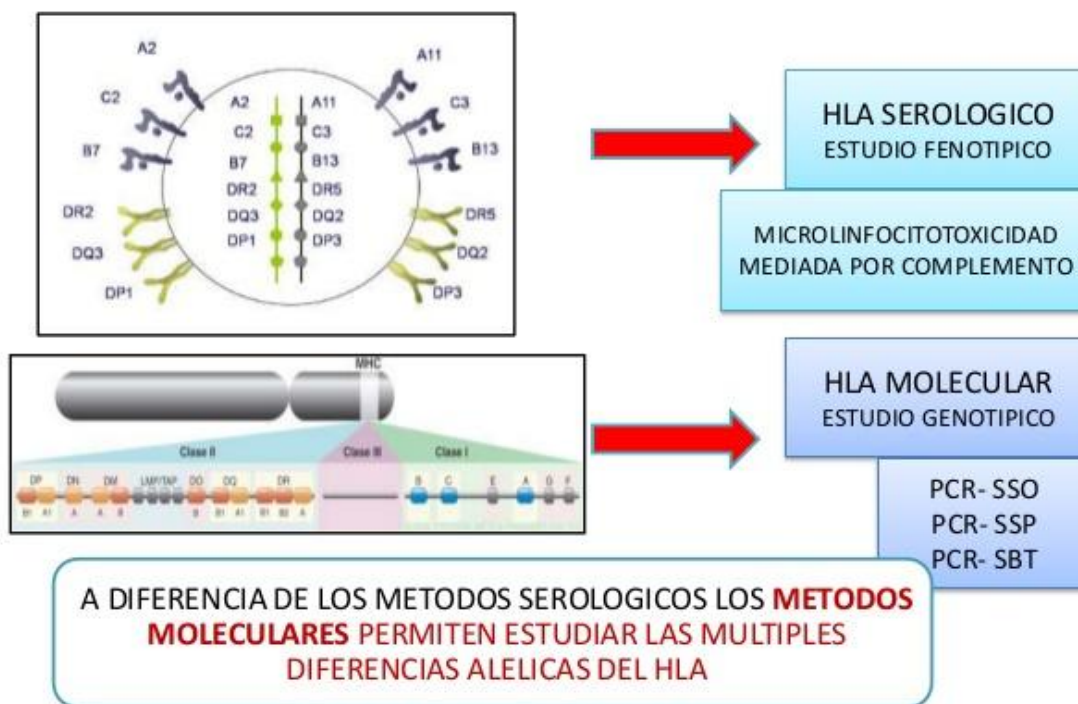


Figura 15. Tipificación HLA por métodos serológicos y moleculares, estudiando el fenotipo HLA hasta la detección de los diferentes alelos HLA por técnicas moleculares.

Métodos Moleculares

PCR-SSP (iniciadores de secuencia específica)

A partir de una muestra de sangre periférica, posterior extracción de ADN y amplificación por técnica de PCR, siendo las mismas PCR-SSP (primers de secuencia específica) y PCR-SSO (oligonucleótidos de secuencia específica) para determinar la tipificación del paciente en estudio, las técnicas moleculares que se pueden desarrollar nos dan distintos niveles de resolución, y dependiendo del trasplante con sus requerimientos de compatibilidad, el tiempo de isquemia fría del órgano a trasplantar, al igual que la disponibilidad de recursos y experiencia, será la técnica a implementar (23,24).

La técnica de PCR-SSP es un método que usa primers de secuencia específica que permitirá amplificar un alelo específico o un grupo de alelos, e involucra un diseño cuidadoso del primers, donde el extremo 3' del mismo debe coincidir sobre el nucleótido de la secuencia polimórfica a ser analizada (alelo). En cada pocillo de reacción hay una mezcla de primers de secuencia específica y un primer control de amplificación. Para visualización de los productos de amplificación se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% con un colorante como bromuro de etidio. Para validar la técnica siempre se debe hacer visible la banda que corresponde al control interno. Suele aplicarse en los casos de trasplantes renales. Figura 16. Esta metodología es útil para tipificar a un donador y a un receptor que están altamente emparentados (por ejemplo padre e hijo).

Ventajas:

- Técnica sencilla
- Requiere instrumental poco sofisticado (Termociclador)
- No requiere el aislamiento de células (se trabaja con sangre entera)
- Resolución mayor que las técnicas serológicas (Resolución intermedia)
- Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos
- Es adecuado para tipificación de donantes cadavéricos

Desventajas

- No es adecuado para tipificación de donantes de médula ósea no relacionados.

- Presenta ambigüedades
- Cada primers amplifica unos pocos alelos del HLA, por lo que será necesario el empleo de un gran número de pares de primers
- No resulta práctico para análisis simultáneo de un gran número de muestras
- No se detecta homocigosis
- Requiere aproximadamente 100 ng de muestra

Técnica PCR-SSP (iniciadores de secuencia específica)

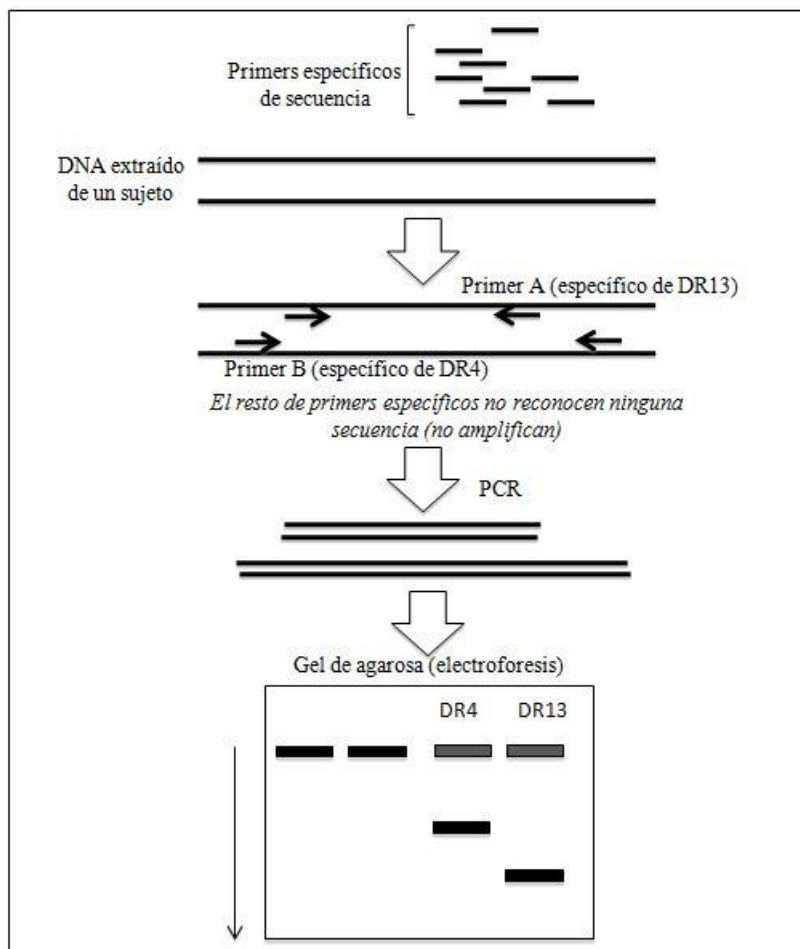


Figura 16. Esquema de la técnica PCR-SSP, se usan primers específicos de un alelo o grupo de alelos. Los productos de la amplificación y el control interno se visualizan mediante una electroforesis en un gel de agarosa con un colorante.

PCR-SSO (sondas de secuencia específica)

En la técnica de PCR-SSO, se realiza como primer paso una amplificación genérica para los locus A y B (exón 2 y 3) y el locus DR (exón 2), luego de la misma, se lleva a cabo una desnaturalización de ese producto y posterior hibridización con las sondas de secuencia específica, específicas para cada alelo HLA. Figura 17. Se aplica a trasplante de médula ósea ya que es un

procedimiento programado con varios días de anticipación y esta técnica posee un nivel de resolución intermedia. Se puede optar por esta tecnología cuando se van a analizar muchos individuos simultáneamente, como en los programas de trasplante de médula ósea, para hacer un primer tamizaje en busca de donadores no relacionados.

Ventajas

- No requiere aislar células nucleadas ya que se utiliza sangre entera
- Técnica de alta resolución
- Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos
- Es posible detectar homocigosis y alelos nulos
- Permite el análisis simultáneo de un número grande de muestras
- Se requieren aproximadamente 20 ng de muestra

Desventajas

- Requiere de varias horas a días (2 o 3)
- Interpretación compleja (reactividad cruzada entre sondas, detección de determinadas combinaciones de alelos producen patrones similares)
- Las condiciones de lavado de las membranas pueden ser diferentes, lo que complica el procesamiento simultáneo de muchas muestras
- Es una técnica compleja y costosa que requiere equipamiento algo más sofisticado (termociclador, horno para hibridización, infraestructura y habilitación para manipular radioisótopos)
- Generación de desechos radioactivos
- A pesar de su elevada resolución ,siguen existiendo ambigüedades

Técnica PCR-SSO (sondas de secuencia específica)

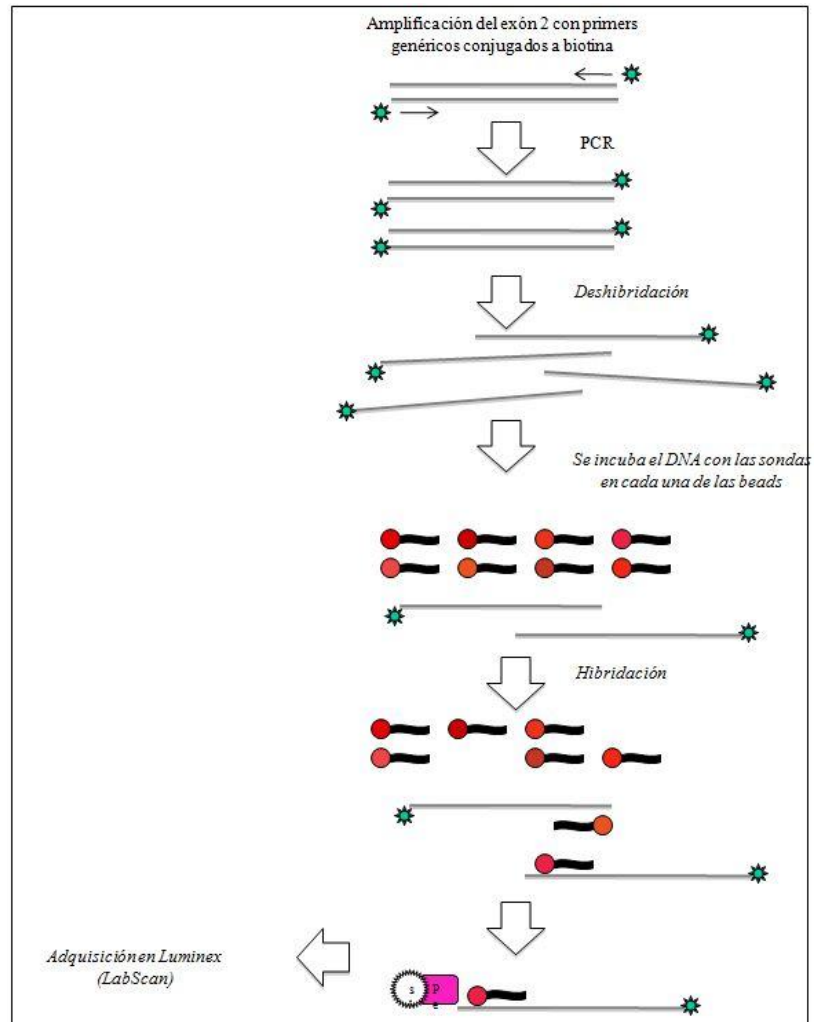


Figura 17. Esquema donde se sintetizan las etapas en una PCR-SSO, tras la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizan sondas de oligonucleótidos específicos de diferentes alelos del sistema HLA, detectando así las especificidades alélicas presentes en el ADN estudiado.

Otra metodología en que se llega a resolución intermedia es mediante la técnica SSO, utilizando plataforma Luminex, cuyos reactivos son comercializados por One Lambda o Inmunocor a nivel mundial. Hay una variante de Luminex LABScan3D con reactivos LABType SSO HD en donde el proveedor informa que se identifican más del 90 % de los pares de alelos comunes en alta resolución sin ambigüedades debido a la presencia de más de 300 sondas unidas a perlas.

En la técnica de alta resolución (PCR-Secuenciación) se realizan PCRs con iniciadores genéricos que amplifican a todos los iniciadores de un gen, posteriormente los productos de PCR se secuencian y los resultados de la secuencia se comparan con base de datos de todos los alelos conocidos para discernir de que alelos se trata. Dado que durante la amplificación y la secuenciación se trabaja simultáneamente con los dos alelos del individuo, incluso aquí pueden llegar a existir ambigüedades pues la combinación de dos alelos pueden llegar a generar la misma secuencia que la combinación de otros dos alelos. Para la resolución de estas ambigüedades pueden emplearse iniciadores específicos que permiten discernir cual de las dos parejas de alelos es la real. No obstante incluso con estos iniciadores pueden llegar a existir algunos remotos casos en los que, la ambigüedad no puede ser eliminada. Sin embargo, estas ambigüedades suelen ser en secuencias que no llegan a afectar el producto proteico del gen y que por lo tanto no tiene relevancia clínica (25).

Esta metodología debe utilizarse cuando se ha elegido a un donador no emparentado para verificar la compatibilidad con el receptor de ese trasplante, es difícil utilizarla como método de tamizaje por la dificultad para procesar muchas muestras simultáneamente.

En la actualidad el método más moderno para tipificar HLA en alta resolución es NGS (Next Generation Sequencing). En el mercado hay distintas presentaciones comerciales, siendo las más frecuentemente usadas las que poseen plataforma de secuenciación Illumina My Seq y reactivo de Illumina TruSight, Miaflora de Inmunocor o Gen Dex. Otra de las plataformas es Ion Torrent, aunque la misma presenta un número importante de ambigüedades.

El alto grado de polimorfismos en los loci del antígeno leucocitario humano (HLA) clase I y clase II, hace que la tipificación de alta resolución sea un desafío. Sin embargo el sistema de secuenciación de próxima generación (NGS) con las plataformas mencionadas y el software adecuado, con un personal de laboratorio bien formado, permiten un genotipado de alta resolución, metodologías impensadas hasta hace muy poco tiempo, estos métodos han revolucionado la investigación genómica y genética cuyo ritmo de crecimiento en ésta área ha sido rápido con distintas aplicaciones biomédicas.

Detección y Monitoreo de Anticuerpos Anti HLA (PRA)

Esta prueba se utiliza para detectar anticuerpos anti HLA preformados, presentes en el suero del potencial receptor. Se estudian con la finalidad de evitar un rechazo hiperagudo o pérdida temprana del injerto.

La producción de anticuerpos frente a moléculas HLA requiere un estímulo antigénico previo. Este estímulo se produce cuando el sistema inmune de un individuo entra en contacto con células procedentes de otro individuo cuyas moléculas HLA sean diferentes (26,27).

Las fuentes más comunes de sensibilización:

- Transfusiones
- Trasplantes previos
- Embarazos y/o abortos

En general, los anticuerpos producidos en mujeres embarazadas son el resultado de una respuesta completamente desarrollada y dirigida frente a un número limitado de antígenos extraños (antígenos fetales heredados del padre) por lo tanto son de alta afinidad y de especificidad limitada, que puede persistir durante un largo periodo de tiempo. Los anticuerpos anti-HLA se producen aproximadamente, en un 25% de embarazadas.

La determinación de la especificidad anti-HLA que presentan los sueros procedentes de pacientes trasplantados puede presentar problemas debido al hecho de que se produce en un individuo inmunodeprimido. El órgano extraño presenta una multitud de antígenos diferentes, esto origina una reacción inmediata por parte de un sistema inmune muchas veces deprimido, lo que conlleva una respuesta policlonal dirigida frente a diferentes antígenos con reacción cruzada, produciéndose también anticuerpos anti-idiotipo, todo ello determina que los anticuerpos que se originan a pesar de ser de tipo IgG sean de baja afinidad y estén dirigidos frente a epítomos públicos de moléculas HLA con reacción cruzada (CREG), pudiendo persistir un gran período de tiempo.

Se precisa una evaluación periódica del suero de los posibles receptores en busca de estos anticuerpos formados luego de algún estímulo antigénico, fundamentalmente después de una transfusión sanguínea (a los 15-30 días de realizadas).

Con este tipo de seguimiento es posible definir patrones de respuesta inmunológica ante los estímulos antigénicos. Tras la realización de una transfusión sanguínea hay pacientes que no muestran respuesta de síntesis de anticuerpos, otros presentan una concentración máxima que posteriormente desaparece en unas pocas semanas y en otros aparecen anticuerpos que se mantienen a pesar de desaparecer el estímulo.

Lo descrito anteriormente permite clasificar a estos pacientes como “respondedores” y “no respondedores”. Es importante tener en cuenta que cuando un paciente desarrolla anticuerpos contra un estímulo antigénico, como una transfusión, aunque estos desaparezcan en 1 ó 2 meses seguirá existiendo la memoria inmunológica y por tanto, el riesgo será más elevado que el de un paciente que nunca haya desarrollado anticuerpos. De ahí la importancia de determinar anticuerpos siempre tras una transfusión sanguínea.

Es necesario determinar el grado de reactividad y la especificidad de los anticuerpos anti-HLA de los individuos incluidos en la lista de espera de trasplante (sobre todo cardíaco y renal), ya que es un factor importante en el momento de la selección y debe figurar en la lista de espera. Por tanto, los sueros de todos los pacientes en lista de espera para trasplante renal deben ser remitidos al laboratorio cada tres meses o cada vez que el paciente haya sido sometido a una transfusión o después de que haya rechazado un injerto. Se considera postransfusional o post-trasplante, el suero obtenido a los 15 días del episodio potencialmente sensibilizante (28,29).

Por otro lado, en algunos episodios de rechazo, se ha descrito la presencia de anticuerpos que reaccionan sólo con antígenos específicos del tejido, expresados en células endoteliales y monocitos, pero no en la membrana de linfocitos. Se ha demostrado que son producidos contra antígenos no polimórficos y otros parecen ser polimórficos. Estos antígenos específicos de tejido podrían ser la razón para algunos rechazos observados en pacientes con prueba cruzada negativa. Son más frecuentes en pacientes retrasplantados y entre ellos tenemos: HPA1-5, AECA (35 y 50 kda), GSST-1, PECAM-1, selectina, anti-Gal-a-1,3Gal.

Detección de anticuerpos Anti-HLA (PRA)

El monitorear periódicamente la presencia de anticuerpos anti-HLA en los sueros de los pacientes que se encuentran en lista de espera para trasplante, es sin duda alguna una de las funciones principales del laboratorio de Histocompatibilidad. La información que se obtiene sirve para conocer el grado de aloinmunización humoral y se expresa como porcentaje de reactividad (%PRA), siendo el máximo

100%. La detección de anticuerpos se ha realizado tradicionalmente basándose en la prueba de microlinfocitotoxicidad de Terasaki. Debe extraerse un suero periódicamente (cada 3 meses) para enfrentarlo a un panel de linfocitos representativo de la población general (constituido por 30 donantes no relacionados). De esta forma se puede determinar el número de donantes contra el que reacciona el suero, lo que se denomina porcentaje de reactividad contra panel (PRA) (30,31). Figura 18.

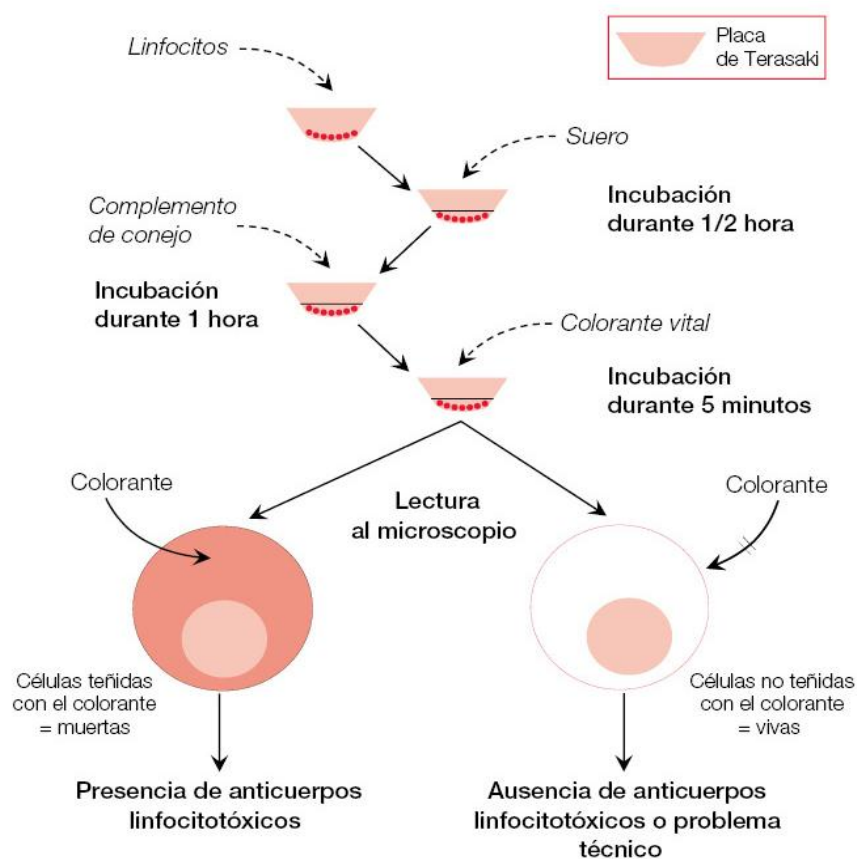


Figura 18. Prueba de Microlinfocitotoxicidad de Terasaki. En ella se basan tanto la tipificación serológica de donante y receptor como la detección de anticuerpos anti-HLA en suero como la realización de la prueba cruzada pretrasplante. Consiste en la incubación de una pequeña cantidad de suero con linfocitos en los pocillos. Si en dicho suero existen anticuerpos que reaccionan con los antígenos de la superficie celular del linfocito, tras la adición de complemento de conejo se producirá la lisis celular. Esta lisis se pone de manifiesto tras la adición de un colorante vital (eosina) que penetra al interior de las células muertas a través de los orificios abiertos por el sistema del complemento.

De igual manera esta prueba permite conocer la especificidad de los anticuerpos formados y esta información nos correlaciona con precisión si existe o no incompatibilidad del receptor con el potencial donante en estudio y la posibilidad de desarrollar algún tipo de rechazo. Asimismo, es una herramienta útil para la selección de donantes en pacientes altamente sensibilizados. En términos generales, mientras mayor es el porcentaje de PRA, más sensibilizado se encuentra el paciente y son menores las posibilidades de tener una prueba cruzada negativa con un potencial donante (32,33).

En párrafos anteriores, se mencionaron los posibles eventos responsables o más comunes de sensibilización. Aproximadamente 33 % de los individuos expuestos a eventos sensibilizantes producen anticuerpos anti-HLA, también otros factores pueden estimular la producción de anticuerpos entre los que se incluyen las vacunas, ciertos procesos infecciosos, pacientes con enfermedades autoinmunes, esto puede complicar la evaluación del paciente y se traduce en respuestas falsas positivas para determinadas pruebas. De ahí la importancia de conocer el perfil histórico de cada paciente candidato a trasplante mediante el monitoreo periódico del suero (34,35).

Para ello, se obtienen los sueros actuales e históricos de los pacientes seleccionados, ordenando los sueros de cada paciente por antigüedad. Se solicita suero actual si el receptor hubiese tenido una transfusión después de la última fecha de extracción de sangre. Si un paciente tiene anticuerpos linfocitotóxicos mayor al 15% se debe obtener una muestra de suero dentro de las 48 horas antes del trasplante para la prueba cruzada.

Es común observar que los pacientes que conforman las listas de espera para trasplante de donante cadavérico con un tiempo prolongado en las mismas, exhiban un alto porcentaje en sus PRA, y por ende disminuye su oportunidad de obtener un donante compatible.

Además del número de donantes contra el que reacciona un suero, es necesario conocer la máxima dilución a la que siguen actuando dichos anticuerpos, es decir, su título. Cuando un anticuerpo se presenta a títulos altos reacciona no sólo contra el antígeno al que va dirigido, siendo también contra otros antígenos que muestran cierta similitud a nivel molecular (a nivel de epítomos, lo que se conoce como grupo de reacción cruzada). Sólo cuando desciende el título de anticuerpos y se reducen estas reacciones cruzadas se limita su espectro de reactividad. En esta situación,

es posible definir las especificidades antigénicas o sea el antígeno contra el Ac va dirigido, que deben ser evitado si se pretende realizar un trasplante.

Dentro de las técnicas empleadas para medir y detectar estos anticuerpos circulantes tenemos:

- Ensayo de linfotoxicidad dependiente de complemento CDC con aumento de AHG.
- Detección de Anticuerpos por ELISA
- Detección de Anticuerpos por Citometría de Flujo basado en la tecnología Luminex

La técnica de linfotoxicidad está siendo progresivamente reemplazada por las técnicas de fase sólida mencionadas anteriormente, las cuales aunque son más caras permiten una mayor rapidez en la obtención de resultados y sobre todo mayor sensibilidad y una mejor caracterización de los anticuerpos presentes en el suero (36).

Detección de Anticuerpos por Elisa

La detección de anticuerpos por la técnica de Elisa (análisis por inmunoabsorción enzimática) utiliza antígenos HLA solubles sintetizados o purificados en el laboratorio o bien los comerciales. Al igual que la técnica de citotoxicidad, la mezcla de antígenos debe ser representativa de la población general. El suero se incuba con el HLA pegado a la placa. Si existen anticuerpos que reconozcan moléculas HLA, se unirán a ellas y quedarán fijadas en la placa. En caso contrario, todas las inmunoglobulinas se eliminarán con los lavados. En un paso posterior la presencia de los anticuerpos fijados se determinará tras incubación con un anticuerpo dirigido frente a inmunoglobulina G (IgG) humana conjugada a una enzima. En caso de que haya anticuerpos anti-HLA esa enzima producirá una reacción colorimétrica al actuar sobre su sustrato en el último paso de la técnica. Esta reacción se cuantifica en un espectrofotómetro. Mediante Elisa se detectan todos los anticuerpos anti-HLA, tanto fijadores de complemento como no fijadores.

Una vez que se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-HLA (clase I o clase II), la especificidad frente a la que se dirigen esos anticuerpos se puede determinar también mediante un Elisa con placas de alta definición o de antígenos únicos, con la misma metodología. A pesar de su alta sensibilidad y especificidad las técnicas de Elisa también están siendo desplazadas por las técnicas que se basan en el uso de citometría de flujo basado en Luminex.

Detección de Anticuerpos por Citometría de flujo

Esta técnica detecta la presencia de anticuerpos anti-HLA mediante el uso de anticuerpos frente a inmunoglobulinas humanas conjugadas a fluorocromos, sin necesidad de que el complemento se fije. El empleo de fluorescencia hace a esta técnica mucho más sensible que la de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) clásica. Este método utiliza sistemas similares al Elisa basados en micropartículas que llevan fijadas en su superficie moléculas HLA de clase I o II. El ejemplo más destacado en esta técnica es que se lleva a cabo con tecnología Luminex.

Principios de la técnica Luminex

La tecnología Luminex se basa en el uso de microesferas de poliestireno (perlas) de 5,6 micrones, cada una internamente teñida o coloreada con una combinación de dos fluoróforos distintos. La combinación de diferentes intensidades de los dos tintes permite la identificación de cada perla por su característica única cuando son estimulados por un rayo láser. Esto permite analizar hasta 10 parámetros simultáneamente en un solo tubo.

La química de la superficie de las esferas o perlas les permite recubrirse químicamente con secuencias de ADN de HLA y antígenos HLA. Las esferas por lo tanto pueden utilizarse para determinar en las muestras la presencia o ausencia de analitos específicos. La plataforma de Luminex utiliza los principios de citometría de flujo para alinear las esferas y pasarlas por un par de láseres. Se utiliza un láser rojo para estimular e identificar así esferas específicas y se utiliza un láser verde para estimular y detectar cualquier tinte asociado a las esferas durante el ensayo. Por cuanto la identificación de las perlas y la fluorescencia asociada capturada por las esferas se realiza en cada perla individual, en un sistema multiplexado puede desarrollarse con, normalmente, hasta 100 esferas.

La asignación del tipo de HLA se basa entonces en la reacción de patrón observado, y se compara la secuencia con diferentes patrones conocidos. El sistema informático asociado interpreta las señales y por lo tanto los anticuerpos HLA enlazado a cada esfera, llegando a un informe detallado.

El patrón de reacción luego se compara con un patrón de reactividad predefinida para cada lote de perlas utilizadas. Las perlas de control positivo y negativo y una muestra de control negativo son utilizadas para control de calidad de la técnica.

Los resultados pueden interpretarse con ayuda de un programa de computadora (software) suministrado con los kits. Sin embargo esto debe ser hecho con la debida consideración del contexto clínico del paciente. Los valores límites (cut off) de reacción positiva recomendados por el proveedor se puede y debe ser ajustado, aumentándolos o disminuyéndolos según procedimientos validados en cada laboratorio de histocompatibilidad.

Cabe destacar que existen diversos reactivos o Kits Luminex, tanto para determinar anticuerpos contra clase I o contra clase II; como así también el estudio de las especificidades o sea contra que antígenos concretos van dirigidos dichos anticuerpos. De este modo en un solo tubo podemos realizar estudios complejos de forma semiautomática.

Una ventaja de la citometría de flujo es que permite cuantificar objetivamente la concentración de los anticuerpos anti-HLA mediante la intensidad media de fluorescencia (MFI). Esto sería algo similar (aunque no igual) al título de anticuerpos que se obtiene haciendo diluciones en los estudios clásicos de linfotoxicidad. Se supone que cuanto más alto sea el MFI de un anticuerpo, mayores posibilidades de que ese anticuerpo sea dañino para el injerto. En la actualidad el problema que surge es que no existe un criterio común entre los diferentes laboratorios para definir qué nivel de anticuerpos (MFI) es relevante y cual no lo es, de forma que cada laboratorio tiene que establecer su punto de corte de MFI. A pesar de este inconveniente, el Luminex se ha convertido hoy en día en el estándar en la mayoría de los laboratorios de histocompatibilidad.

El luminex permite conocer de una forma muy detallada y precisa cuales son las especificidades antigénicas contra las que reacciona el receptor (antígenos prohibidos) y cuales contra las que no reacciona (antígenos permitidos), de esta forma define muy claramente qué donantes podrían ser compatibles con el receptor a priori, incluso antes de hacer la prueba cruzada.

El luminex aporta una gran cantidad de información, por lo que se han desarrollado programas informáticos basados en el análisis de los epítopes característicos de cada molécula HLA, y las características de los anticuerpos detectados. Así se puede precisar el grado de compatibilidad que existe entre los epítopes del donante, los del receptor y las especificidades de los anticuerpos presentes en Luminex, lo cual ayuda a mejorar las búsquedas de donantes sobre todo en el caso de pacientes polisensibilizados.

Ciertamente en nuestros días se cuenta con alta tecnología para el monitoreo de los anticuerpos anti HLA y la responsabilidad de los laboratorios de Histocompatibilidad es identificar en el receptor de trasplantes estos anticuerpos

anti-HLA clínicamente relevantes dirigidos contra el potencial donante en estudio. Para lograr su identificación es conveniente establecer las siguientes estrategias para evaluar la sensibilización de los pacientes candidatos a trasplante.

- Identificar primero si el paciente presenta o no aloanticuerpos anti-HLA y si están dirigidos contra antígenos HLA de clase I, de clase II o ambos
- Caracterizar la especificidad de los anticuerpos anti-HLA de clase I y de clase II
- Monitorear periódicamente la producción de anticuerpos anti-HLA tanto en pacientes no sensibilizados como en aquellos que ya los presentan para conocer su perfil de anticuerpos y títulos de los mismos.

Estos lineamientos nos permiten tener una mejor interpretación de las pruebas cruzadas linfocitarias y definir el tipo de antígenos HLA a los que el paciente a trasplantar puede ser expuesto. Se debe hacer mención y recordar que ni aún el más potente inmunosupresor es efectivo en contra de la respuesta de memoria del sistema inmune, el cual incrementa los niveles de anticuerpos anti-HLA si se le reexpone a esos antígenos HLA presentes en el injerto.

Pacientes trasplantados con bajos porcentajes de PRA menor a 30% presentan mejores sobrevivencias de los injertos comparándolos con los pacientes de PRA's altos, de igual manera pacientes candidatos a retrasplante con presencia de anticuerpos anti-HLA debido al primer trasplante exhiben curvas con disminución en la sobrevivencia del injerto.

El papel de la compatibilidad HLA es confuso en algunos tipos de trasplantes y claramente evidente en otros. Además, el estudio de las moléculas HLA en trasplante de órganos es complicado debido a la multiplicidad de factores y mecanismos inmunológicos y no inmunológicos que puedan intervenir en estos procesos.

Prueba cruzada o cross match

La prueba cruzada consiste en el análisis de la sensibilización humoral específica del receptor contra el donante. Esta técnica, basada también en la prueba de microlinfotoxicidad de Terasaki e instaurada a mediados de la década de 1960, es obligatoria antes de la realización del trasplante. Con ella se consiguió reducir la frecuencia de rechazo hiperagudo hasta valores muy bajos (37,38).

Prueba Cruzada Clásica por citotoxicidad

Esta prueba consiste en la incubación de suero del receptor con linfocitos del donante, si se produce lisis celular tras la incubación con complemento de conejo se interpreta que existen anticuerpos en el suero del receptor específicos contra el donante y un riesgo elevado de rechazo hiperagudo. Esta condición se considera una contraindicación absoluta para la realización del trasplante. Habitualmente la prueba se lleva a cabo con el suero que históricamente haya mostrado una mayor reactividad y con el más reciente, congelados previamente. Cabe la posibilidad de que exista reactividad en sueros recogidos un tiempo atrás, sin que pueda detectarse en sueros más recientes. Esta situación, que se suele definir como prueba cruzada histórica positiva y actual negativa tiene una especial significación y su interpretación es discutida, aunque en general puede aceptarse la realización del trasplante cuando la prueba cruzada con el suero actual es negativa y se detecta reactividad en sueros antiguos de más de un año.

En ocasiones pueden existir anticuerpos no linfocitotóxicos (que no producen una prueba cruzada positiva) que sean nocivos para el injerto. Esto puede ser debido a la existencia de anticuerpos anti-HLA no reconocidos o a la de diferentes anticuerpos no dirigidos contra el sistema antigénico endotelio-monocítico. Entre estos anticuerpos han adquirido importancia los anticuerpos anti-MICA. MICA codifica en la misma región del cromosoma 6 humano que HLA (como se mencionó en la descripción de la organización génica y estructura del sistema HLA), también es polimórfico por lo que funciona como un aloantígeno, capaz de generar una alorespuesta humoral. Sin embargo, sólo se expresa en células endoteliales, especialmente tras activación, por lo que no se pueden detectar en una prueba cruzada convencional. Los anticuerpos anti-MICA también pueden detectarse por tecnología de citometría de flujo y Luminex, aunque su verdadera relevancia no está claramente establecida.

Prueba Cruzada por Citometría de Flujo

Es un método de inmunofluorescencia indirecta, independiente de complemento, leído en Citómetro de Flujo con rayo láser. Por su alta sensibilidad es indicado en pacientes de mayor riesgo de rechazo humoral o pérdida temprana de injerto, permitiendo junto a otros análisis estimar el riesgo de trasplante para un paciente determinado. Es usado tanto en el período pretrasplante como post-trasplante.

Cuando se sospeche la existencia de anticuerpos anti-HLA a pesar de una prueba cruzada negativa, es posible aumentar la sensibilidad de la técnica aumentando el período de incubación o bien añadiendo anticuerpos antiinmunoglobulina humana (para detectar aquellos anticuerpos incapaces de activar el complemento). Sin embargo el método más sensible es la realización de la prueba cruzada por citometría de flujo, capaz de detectar anticuerpos en títulos muy bajos y anticuerpos que no activen el complemento como ya se mencionó.

Aunque no está claro si los anticuerpos detectados con este método son realmente nocivos, parecen relacionarse con rechazos más frecuentes y más graves, así como menor supervivencia a medio plazo, sobre todo en aquellos pacientes que perdieron un primer trasplante de forma precoz y en pacientes sensibilizados previamente al trasplante. En estos pacientes de alto riesgo es aconsejable la realización de la prueba cruzada por uno de estos métodos, por sus notables ventajas en sensibilidad, especificidad, rapidez de procesamiento y es más objetiva su lectura ya que la realiza un equipo.

Prueba cruzada virtual

Cuando se hace un análisis detallado de los anticuerpos presentes en un suero con las técnicas de fase sólida se puede predecir si ese suero va a reaccionar contra las células de un determinado donante, una vez conocidos los antígenos HLA del mismo. Si el donante posee o tiene alguno de los antígenos prohibidos definidos en el receptor, la prueba cruzada será previsiblemente positiva y esto es lo que se llama Prueba Cruzada Virtual. El resultado de la misma permite ganar tiempo y poder tomar la decisión de si un órgano es válido para un receptor que se encuentra en otra ciudad o país, sin tener que enviar linfocitos del donante o hacer la prueba cruzada clásica por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)(39,40).

Como ya se hizo mención las técnicas en fase sólida son de gran sensibilidad por lo que es frecuente encontrar en la práctica casos con una prueba cruzada virtual positiva en los que luego la prueba cruzada por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) arroje un resultado negativo. En estos casos es difícil tomar la decisión de trasplantar o no. Si la prueba cruzada por CDC es negativa es casi imposible que se produzca rechazo hiperagudo, pero si la prueba cruzada virtual es positiva es probable que acabe produciéndose un rechazo agudo o crónico mediado por anticuerpos por lo que hay que valorar el riesgo en cada paciente, en función de las características de los anticuerpos responsables de esa prueba cruzada virtual positiva (41,42).

A continuación se mencionan y describen en forma breve diferentes reactivos que existen actualmente en el mercado. En este importante ámbito dentro de la histocompatibilidad, One Lambda líder mundial en tipificación HLA ofrece una colección de reactivos para ayudar a identificar anticuerpos que pueden causar rechazo del injerto. La selección de ensayos varía en formato, sensibilidad y especificidad. Todos los productos están diseñados para facilitar su uso, la eficiencia del laboratorio y automatización optimizada.

One Lambda ha sacado al mercado mundial la línea de detección de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA mediante la tecnología de Luminex (xMAP).

Sus principales ámbitos de aplicación se encuentran en la monitorización de los pacientes pretrasplantados y postrasplantados de órganos sólidos.

Como principales beneficios o ventajas se pueden mencionar:

- Mayor sensibilidad
- Mayor especificidad
- Detección de anticuerpos HLA no fijadores de complemento
- Sin interferencias por autoanticuerpos
- Detección de anticuerpos de clase I y II por separado
- Diferencia las reacciones debidas a anticuerpos IgG de las debidas a IgM
- Ahorro de tiempo del personal
- Homogeneidad del panel antigénico a lo largo del tiempo
- Mayor productividad, hasta 100 analitos por pocillo. Ahorra costos y tiempo.
- Antígenos HLA purificados

Al trabajar con antígenos purificados no se producen reacciones falsas positivas debidas a anticuerpos no HLA.

Cuando se dispone de un software de análisis como se ha mencionado anteriormente, como así también de personal entrenado en la interpretación correcta de la información que arroja el software, el laboratorio puede llevar a cabo un exhaustivo estudio de las muestras. Del mismo modo permite observar a lo largo del tiempo la evolución de los anticuerpos en el enfermo, controlando la eficacia de la terapia suministrada.

Es de destacar que esta tecnología se ajusta tanto a laboratorios con número de muestras pequeño como grande debido a la posibilidad de poder indistintamente de muestra a muestra, mediante la utilización de tubos, como 96 muestras simultáneamente.

Otros reactivos o Kits de One Lambda disponibles en el mercado para laboratorios de histocompatibilidad

LABScreenMixed: Determina la existencia o no de anticuerpos anti-HLA y MICA en la muestra.

Es un sistema rápido de indentificar las muestras positivas. Detecta simultáneamente anticuerpos Clase I y II y MICA.

Está compuesto por 21 grupo de antígenos.

- Control positivo

- Control negativo

- Clase I: 12 grupos

- Clase II: 5 grupos

- MICA: 2 grupos

Al mismo tiempo debido al elevado número de antígenos que se utilizan se puede hacer un seguimiento del paciente a lo largo del tiempo

LABScreenMulti: Se compone de antígenos HLA clase I, clase II y anticuerpos HNA: 1A, 1B, 1C, 3. Diversos estudios han mostrado la implicación de anticuerpos anti—HLA y anti-HNA en casos clínicos de TRALI (lesión pulmonar aguda producida por transfusión).

LABScreen Single Antigen: Cada antígeno HLA se fija individualmente en un grupo de perlas, sin compartir los perlas con otros. Esto es muy interesante en pacientes hiperinmunizados donde, con los métodos tradicionales, es difícil localizar antígenos frente a los cuales no se tengan anticuerpos, y por tanto, reduciendo la posibilidad de un trasplante.

Con tal reactivo se pueden detectar anticuerpos anti-Clase I y anti-Clase II, también hay q mencionar que una de las últimas incorporaciones que se le al LABScreen Single Antigen son un grupo extra de antígenos tanto de Clase I como de Clase II, los mismos tiene una representación más frecuente en algunas poblaciones étnicas. De esta manera se puede ampliar y obtener un perfil más

completo de anticuerpos del paciente en estudio. Actualmente también se dispone de un reactivo específico LSMICA001 Single Antigen para la identificación de anticuerpos anti MICA.

LABScreen específico: Identifica los anticuerpos presentes en la muestra. En un único tubo se encuentran todos los grupos de perlas, con los antígenos representados conforme a su frecuencia presente en la población.

Dependiendo de si se quiere detectar anticuerpos Clase I y/o Clase II existen dos diferentes productos o reactivos. Se pueden utilizar de manera separada o conjunta en el mismo proceso.

QUANTIPLEX : En los laboratorios de histocompatibilidad existe interés en medir la concentración de anticuerpos anti-HLA en pacientes trasplantados, para su seguimiento.

Recientemente existen estudios que relacionan el nivel de anticuerpos con el rechazo al injerto.

FlowPRA: Diseñado para su uso en la detección de citometría de flujo. Permite detectar anticuerpos en suero humano, asignando un porcentaje de PRA y la especificidad de anticuerpos para HLA clase I y clase II.

Quantiplex de la marca One Lambda estandariza las señales de fluorescencia de Luminex. Elimina las posibles variaciones que el equipo puede tener en las lecturas en momentos diferentes. Esto permite que una muestra procesada en repetidas ocasiones arroje un valor de intensidad media de fluorescencia (MFI) idéntica, lo que permite hacer un seguimiento de la evolución en la fuerza de un determinado anticuerpo anti-HLA en un paciente postrasplantado a lo largo del tiempo. A mayor MFI mayor nivel de anticuerpos y a su vez mayor posibilidad o probabilidad de rechazo.

Adsort Out: One Lambda diseña este producto con la finalidad de reducir señales de fondo llamadas “background” que en determinadas muestras se produce por uniones inespecíficas de componentes presentes en el suero humano a las perlas que se utilizan en el análisis por citometría de flujo.

Puede utilizarse cuando a la muestra se le va a estudiar los anticuerpos mediante cualquiera de los productos mencionados anteriormente como LABScreen de One Lambda.

Conclusiones

Las pruebas de histocompatibilidad proporcionan los datos necesarios para evaluar el riesgo inmunológico del paciente que será sometido al procedimiento de trasplante. El tipo de pruebas o técnica que se requieran dependerá de las necesidades específicas de cada programa, como son el tipo de trasplante, tiempo de espera del mismo, episodios aloinmunizantes previos, recursos del laboratorio de histocompatibilidad como también la formación o capacitación del personal del mismo.

El método más usado y antiguo para la tipificación de HLA es la prueba de microlinfotoxicidad desarrollada por el Dr. Terasaki. Si bien la técnica mencionada sirvió históricamente por más de 30 años a los laboratorios de histocompatibilidad y logró estandarizarse en todo el mundo, actualmente y debido al alto polimorfismo que presenta el sistema HLA con numerosas variantes alélicas la tipificación basada a nivel del DNA ha permitido mejorar la asignación del fenotipo HLA del paciente en estudio, eliminando errores que presenta la tipificación HLA por serología, facilitando una mayor identificación del grado de compatibilidad entre el receptor y su potencial donante traduciéndose en mejores resultados clínicos.

El tipo de método para tipificación a nivel molecular (SSP, SSO, Luminex, NXT) dependerá del grado de resolución, baja media o alta que cada programa de trasplante requiera al igual que la disponibilidad de recursos y experiencia como ya se mencionó.

Ha quedado perfectamente demostrado el efecto benéfico que se alcanza cuando el genotipo HLA entre el receptor y el donante es idéntico, esto se traduce en un aumento en la sobrevida del trasplante, disminución de los episodios de rechazo como así también una notable reducción en la cantidad de fármacos inmunosupresores administrados.

En el caso de individuos genéticamente no relacionados como el donante cadavérico no es posible identificar haplotipos y se habla de número de antígenos o alelos que comparten, es decir, si se realiza la identificación de los tres pares de alelos del HLA A, B, DR y la identidad entre receptor-donante es de cero disparidades o seis antígenos iguales estamos frente a una alta compatibilidad, y si el caso es de seis disparidades o seis antígenos diferentes la compatibilidad es nula.

En términos generales, a mayor compatibilidad es mejor también la sobrevida esperada del trasplante, aunque para niveles intermedios de compatibilidad esta diferencia es menos importante probablemente con los tratamientos inmunosupresores modernos.

Por medio de líneas de investigación desarrolladas en todo el mundo, se espera poder conocer con más claridad y detalles, los diferentes y complejos mecanismos involucrados en un procedimiento de trasplante, antígenos HLA no clásicos, las moléculas de histocompatibilidad menores en trasplante, estudiar la presencia de anticuerpos HLA post-trasplante, el papel que desempeñan los anticuerpos no HLA y también el estudio de otros sistemas de histocompatibilidad menores en trasplante como los que se encuentran en el de médula ósea (HA-1, HPA1-5).

Glosario

aa: aminoácido

ABO: sistema de grupos sanguíneos ABO

Acs: anticuerpos

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ag: antígeno

ALG: globulina antilinfocitaria

ARN: ácido ribonucleico

C4A: variante de la molécula C4 del complemento

C4B: variante de la molécula C4 del complemento

CDC: citotoxicidad dependiente de complemento

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: células presentadoras de antígenos

EICH: enfermedad injerto contra huésped

ELISA: análisis por enzimoimmunoensayo

CREG: Reacción cruzada

HLA: sistema de antígenos leucocitarios humanos

HLA I: antígeno leucocitario humano clase I

HLA II: antígeno leucocitario humano clase II

HSP: (heat shock proteins) proteínas de shock térmico

IgG: inmunoglobulina G

IL-2: interleucina 2

INCUCAI: Instituto Nacional Central Único de Ablación e Implante

LB: linfocito B

LT: linfocito T

LT CD4: subpoblación linfocito cooperador

LT CD8: subpoblación linfocito citotóxico

MICA: antígeno polimórfico codificado en el cromosoma 6

MICB: antígenos polimórfico codificado en el cromosoma 6

MFI: intensidad media de fluorescencia

NGS: (Next Generation Sequencing) secuenciación de próxima generación

OMS: organización mundial de la salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR-SSO: reacción en cadena de la polimerasa-oligonucleótido de secuencia específica

PCR-SSP: reacción en cadena de la polimerasa-primers de secuencia específica

%PRA: porcentaje de anticuerpos reactivos

RH: factor RH

TCR: receptor de la célula o linfocito T

TNF: factor de necrosis tumoral

TRALI: lesión pulmonar aguda producida por transfusión

Bibliografía

1. Küss R, Bourget P. An Illustrated history of organ transplantation. The great adventure of the century. France: Laboratories Sandoz. Rueil Malmaison; 1992, p.36.
2. Cicciarella JC. HLA typing immunogenetics and transplantation. Cur Op Or Transplant 2004; 9:1-7.
3. Segev D, Centry S, Warren D, et al. Kidney Paired Donation and Optimizing the Use of live Donor Organs. JAMA, 2005;293:1883-1890.
4. Tanabe K, Takahashi K, et al. LongTerm results of ABO-Incompatible living kidney transplantation. Transplantation 1998; 65:224-8.
5. ASHI Laboratory Manual, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (4a. ed). Lenexa, KS; 2000.
6. Opelz G, Wujciak B, et al. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative transplant study. Rev Immunogenetics 1999; 1:334-42.
7. Hubbel C, Kamoun M, et al. Guideline for the development of joint written agreements between histocompatibility laboratories and transplant programs. ASHI Quarterly 2004; 28(3):96-8.
8. Véliz, L., Suarez, P., Rodriguez, N., Perez, C., Rege, E., Brochero, B., Surur, D., Anastasio Campot, C: "Transplante renal, complicaciones urológicas inmediatas", Actas del XXIX Congreso de la Federación Argentina de Urología y XXXVII Congreso de la Sociedad Argentina de Urología, Mendoza, 1999.
9. Manns, M.; Sigler, M., Teehan, B.: "Continuous renal replacenment therapies: An update", Am. J Kidney Dis., 185-199, 1998.
10. Sollinger HW, Odorico Js, Knetchtle SJ, et al. Experience with 500 simultaneous pancreas-Kidney transplants. Am Surg 1998; 228: 284-296.
11. Abbas AK, Lishtman A, Pober J. Respuestas inmunitarias a los trasplantes celulares. In Abbas, Lishtman, Pober. Inmunología Celular y Molecular. 2ª edición Madrid, España: Interamericana 1995:379-398.
12. INCUCAI. Comunidad: Historia del Trasplante. Disponible en URL: <http://www.incucal.gov.ar/comunidad/historia.i.sp>
13. Cecka JM. The role of HLA in renal transplatation. Hum Imnunol 1997; 56:6-16.

14. Taylor CJ, Smith SI, Sharples LD, et al. Human leucocyte antigen compatibility in heart transplantation. *Transplantation* 1997; 63:1346-1351.
 15. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. "Complejo principal de Histocompatibilidad" *Inmunología celular y molecular*. 6ta. Edición. 2008. cap .5.
 16. Fainboim L; Geffner J. (2012). Estructura y función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. *Introducción a la inmunología Humana*. 6° edición Capítulo 4. Buenos Aires: Talleres Gráficos SRL.
 17. Janeway CA, Travers, Walport, Capra.Masson JD.(2000).*Inmunología*. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 4ta edición. Barcelona: Masson SA.
 18. Manual Técnico . Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. El sistema HLA . 17° edición (2012). Capítulo 19.
 19. *Rev Invest Clin* 2005, Artículo Especial. "Pruebas de histocompatibilidad en el programa de Trasplante".
 20. Claudia de Leo Cervantes. Laboratorio de Histocompatibilidad. Departamento de Trasplantes. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zuribán. México.
 21. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting Kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004; 4:438-443.
 22. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003 June; 3(6).665-673.
 23. Bunce M, Yuong NT. Molecular HLA typing-the brave New World. *Transplantation* 1997; 64:1505-1513.
 24. Dausset J. The HLA adventure. In *History of HLA: Ten recollections*, (ed.Terasaki PI). Los Angeles, CA: UCLA Tissue Typing Laboratory; 1990, p.3-17.
 25. Erlich HA, Opelz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity* 2001 April; 14(4):347-356.
 26. Akalin E, Pascual M. Sensitization after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006 May; 1(3):433-440.
 27. Class FH, Doxiadis IL. Management of the highly sensitized patient. *Curr Opin Immunol* 2009 October; 21(5):569-572.
- transplantation. *Int J Immunogenet* 2008. August;35(4-5):275-277.

28. Amico P, Honger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads.
29. Duquesnoy RJ, Mary M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation* 2009 August; 14(4):403-9.
30. Cecka. Calculated PRA (cPRA): The new Measure of sensitization for transplant candidates. *Am J Transplant* 2010; 2010:26-29.
31. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, Leffell MS. Calculated PRA: Initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive cross matches. *Am J Transplant* 2011;11:719-724.
32. Tait BD, Süsal C, Gebel M, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95:19-47.
33. Van den Loonen E, Billen E, Voorter C, et al. Clinical relevance of pretransplant donor directed antibodies detected by single antigen beads in highly sensitized. *Class FH. HLA antibody testing: a tool to facilitate not to prevent organ transplantation. Int J Immunogenet* 2008. August;35(4-5):275-277.
34. Class FH. HLA antibody testing: a tool to facilitate not to prevent organ transplantation. *Int J Immunogenet* 2008. August;35(4-5):275-277.
35. Zeevi A, Gimita A, Duquesnoy R. HLA antibody analysis: sensitivity, specificity, and clinical significance in solid organ transplantation. *Immunol Res* 2006;36(1-3):255-264.
36. Tait BD. Solid phase assay for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 2009 October; 21(4-5):573-577.
37. Donaldson PT, Williams R. Cross-matching in liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63:789-794.
38. Lee PC, Ozawa M. Reappraisal of HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation. *Clin Transplantation* 2007; 21:219-226.
39. Amico P, Honger G, Steiger J, Schaub S. Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009 December; 14(6):656-61.

40. Ferrari P, Fidler S, Holdsworth, et al. High transplant rates of sensitized recipients with virtual crossmatching in kidney paired donation. Transplantation 2012; 94:744-748.
41. Bingham AW, Murphey CL, Palma-Vargas J, Wright F. A virtual crossmatch protocol significantly increases access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation. Transplantation 2008; 86:1864-1868.
42. Protocolo Nacional de donación cruzada. Disponible en :<http://www.ont.es/infesp/Paginas/DocumentosdeConsenso.aspx>

